

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 juillet 1997 (17.07.97)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 96/884
Demande internationale no PCT/FR96/01756	Date de priorité (jour/mois/année) 06 décembre 1995 (06.12.95)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 novembre 1996 (07.11.96)	Date de priorité (jour/mois/année) 06 décembre 1995 (06.12.95)
Déposant CAPUT, Daniel etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

02 juillet 1997 (02.07.97)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Jocelyne REY-MILLET no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/07/98
SOCO

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

15 juillet 1998 (15.07.98)

Demande internationale no

PCT/FR96/01756

Date du dépôt international

07 novembre 1996 (07.11.96)

Déposant

SANOFI etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

_____ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3a))

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

A. Karkachi

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BET 96/884	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR96/01756	International filing date (<i>day/month/year</i>) 07 November 1996 (07.11.1996)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 06 December 1995 (06.12.1995)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 15/85, 5/10, C12Q 1/68, C12N 15/11, G01N 33/53, C07K 16/28, G01N 33/577, 33/68, A61K 38/17		
Applicant SANOFI		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 July 1997 (02.07.1997)	Date of completion of this report 19 February 1998 (19.02.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR96/01756

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-47, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-43, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR96/01756

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 36

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. Point 2 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01756

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

see separate sheet

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01756

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-35, 37-43	YES
	Claims	36 (no opinion)	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-35, 37-43	YES
	Claims	36 (no opinion)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-43	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

see separate sheet

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01756

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

1. The claims are not clear.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 96/01756

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: separate sheet

- 1) The purification of the specific interleukin-13 receptor (IL-13) does not appear either to be described by or to be obvious from the prior art documents as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1-64.3). Claims 1 to 35 and 37 to 43 therefore appear to satisfy the criteria of PCT Article 33(2) and (3).
- 2) The PCT does not contain uniform criteria for assessing whether claim 36 meets the requirement of novelty of PCT Article 33(2). Patentability can also depend on the wording of the claim. Thus, the European Patent Office does not consider a known product to be novel (in this case interleukin 13 for example), merely because it is obtained by a novel method.
- 3) The present application does not meet the requirements of PCT Article 6 for the following reasons:
 - a) The expression "derived from..." in claims 1 and 8 is vague, thereby giving rise to doubt as to the real scope of these claims.
 - b) Similarly, the definitions of the sensors of claims 18 and 21 cover such a large number of possibilities that the scope of the claims cannot be clearly appreciated. This objection also applies

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 96/01756

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: separate sheet

to the term "modulator" used in claim 36. It should be noted that sensors of certain nucleotides which are already known fit the definition given in claims 1 and 8. It therefore appears that short of clarification, the novelty (PCT Article 33(2)) of claims 1 and 8 could be questioned (as regards claim 36, cf. point 2 above).

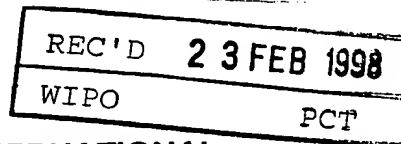
- c) In claim 24, the expression "sequences forming the reading frame coding for a polypeptide as described in any one of claims 1 to 4 and 8 to 10 in the transcript" is unclear, since the applicant does not appear to have identified these sequences in the application.
- 4) The present preliminary examination report has been drawn up on the assumption that all the claims are entitled to the claimed priority. Thus, the documents "The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no.46, pages 29265-29270" and "The Journal of Biological Chemistry, vol.271, no. 28, pages 16921-16926" have not been considered to form part of the prior art as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1-64.3).
- 5) Claims 1 to 43 appear to be industrially applicable as defined by PCT Article 33(4).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/11/79 5000 T21

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 96/884	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR96/01756	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/11/1996	Date de priorité (jour/mois/année) 06/12/1995
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant SANOFI et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 02/07/1997	Date d'achèvement du présent rapport 19.02.98
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Kaas, V N° de téléphone (+49-89) 2399-8704 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/01756

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-47 version initiale

Revendications, N°:

1-43 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
☒ les revendications n°s 36.

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s cf. feuille séparée, point 2. en question, se rapportent à

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/01756

l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

voir feuille séparée

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-35, 37-43 Non : Revendications 36 (pas d'opinion)
Activité inventive	Oui : Revendications 1-35, 37-43 Non : Revendications 36 (pas d'opinion)
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-43 Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR96/01756

1) La purification du récepteur spécifique de l'interleukine 13 (IL-13) ne semble ni décrit ni découler de manière évidente des documents de l'état de technique tel qu'il est défini dans le règlement d'exécution (règles 64(1)-(3) PCT). Les revendications 1 à 35 et 37 à 43 semblent donc satisfaire aux critères énoncés par les Articles 33(2) et 33(3) PCT.

2) Il n'existe pas de critère unique dans le PCT pour déterminer si la revendication 36 est susceptible de remplir la condition de nouveauté énoncée par l'Article 33(2) PCT. La brevetabilité peut également dépendre de la manière dont la revendication est formulée. Ainsi, l'Office Européen des Brevets ne considère pas comme nouveau un produit connu (dans le cas présent, par exemple l'interleukine 13), uniquement du fait qu'il est obtenu par un nouveau procédé.

3) La présente demande ne remplit pas les conditions de l'Article 6 PCT pour les raisons suivantes:

a) L'expression "dérivée de.." dans les revendications 1 et 8 est vague, ce qui engendre un doute sur la portée réelle de ces revendications.

b) De même, les définitions des sondes des revendications 18 et 21 englobent un nombre tellement élevé de possibilités que la portée des revendications ne peut être clairement appréciée. Cette objection s'applique également au terme "modulateur" utilisé dans la revendication 36. Il est à noter qu'il ne fait pas de doute que des sondes de quelques nucléotides déjà connues entrent dans la définition donnée dans les revendications 1 et 8. Il apparaît donc qu'en absence de clarification, la nouveauté (Article 33(2) PCT) des revendications 1 et 8 pourrait être mise en question (en ce qui concerne la revendication 36, cf. point 2 ci-dessus).

c) Dans la revendication 24, l'expression "séquences constituant le cadre de lecture codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10 au niveau du transcript" n'est pas claire, la demanderesse ne semblant pas avoir identifié ces séquences dans la demande.

4) Le présent rapport d'examen préliminaire a été établi avec la présomption que toutes les revendications bénéficient du droit de priorité revendiqué. Ainsi, les docu-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

Demande internationale n° PCT/FR96/01756

ments "The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 46, pages 29265-29270" et "The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 28, pages 16921-16926" n'ont pas été considérés comme faisant partie de l'état de la technique tel qu'il est défini dans le règlement d'exécution (Règles 64(1)-(3) PCT).

5) Les revendications 1 à 43 semblent susceptibles d'application industrielle telle que définie par l'article 33(4) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 96/884	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 96/ 01756	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/11/1996	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 06/12/1995
Déposant SANOFI et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☒ déposé avec la demande internationale

☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n° ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 96/01756

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N15/12	C07K14/715	C12N15/85	C12N5/10	C12Q1/68
	C12N15/11	G01N33/53	C07K16/28	G01N33/577	G01N33/68
	A61K38/17				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)					
CIB 6	C12N	C07K	C12Q	G01N	A61K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
A	FEBS LETTERS, vol. 366, no. 2-3, 12 Juin 1995, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 122-126, XP002010891 S. LEFORT ET AL.: "IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells." cité dans la demande voir abrégé * discussion *				8,9,11, 12,35,40
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents					
<input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe					
* Catégories spéciales de documents cités:					
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée					
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
20 Février 1997			11. 03. 97		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016			Nooij, F		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 8, 24 Février 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 3512-3517, XP002010892 N. VITA ET AL.: "Characterization and comparison of the interleukin 13 receptor with the interleukin 4 receptor on several cell types." cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,35,40
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 15, 14 Avril 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 8797-8804, XP002010893 N. OBIRI ET AL.: "Receptor for interleukin 13." cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12, 31-36, 40,43
A	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 23, 9 Juin 1995, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 13869-13878, XP002010894 S. ZURAWSKI ET AL.: "The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor." voir abrégé voir discussion</p> <p>---</p>	8,9,11, 12
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 46, 15 Novembre 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 29265-29270, XP002025818 M. JAVAD AMAN ET AL.: "cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain." voir figures 1,2 voir abrégé</p> <p>---</p>	8,9,11, 12,14, 16,17, 21-23, 25-30, 35,40
P,X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 Juillet 1996, BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS, pages 16921-16926, XP002025819 D. CAPUT ET AL.: "Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain." voir figure 3 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2,5,6, 14-19, 29,30, 35,39
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 96/01756

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	<p>IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 3, Mars 1996, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 108-110, XP002010895 R. CALLARD ET AL.: "IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same?" voir figure 1</p> <p>-----</p>	1-43

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/077817
41 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 1998

INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

PCT/FR96/01756

filed on November 7, 1996

in the name of SANOFI

ENGLISH TRANSLATION OF THE AMENDMENTS
TO THE CLAIMS UNDER PCT ARTICLE 19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26. Use of a probe according to any one of Claims 18 to 23, as *IN VITRO* diagnostic tool for the detection, by hybridization, of the nucleic acid sequences encoding a polypeptide according to any one of Claims 1 to 4 or 8 to 10, in biological samples, or for revealing aberrant syntheses or genetic abnormalities such as the loss of heterozygosity or genetic rearrangement.

27. Use of a probe according to any one of Claims 18 to 23 for the detection of chromosomal abnormalities.

28. *IN VITRO* diagnostic method for the detection of aberrant syntheses or of genetic abnormalities at the level of the nucleic acid sequences encoding a polypeptide according to any one of Claims 1 to 4 or 8 to 10, characterized in that it comprises:

- bringing a nucleotide probe according to any one of Claims 18 to 23 into contact with a biological sample under conditions allowing the formation of a hybridization complex between the said probe and the above-mentioned nucleotide sequence, optionally after a preliminary spell of amplification of the above-mentioned nucleotide sequence;
- detection of the hybridization complex which may be formed;
- optionally, sequencing the nucleotide sequence forming the hybridization complex with the probe of the invention.

29. Use of a nucleic acid sequence according to any one of Claims 5 to 7 and 11 to 13 for the production of a recombinant polypeptide according to any one of Claims 1 to 4 and 8 to 10.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/077817

1) Rec'd PCT/PTO 03 JUN 1998

INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

PCT/FR96/01756

filed on November 7, 1996

in the name of SANOFI

AMENDMENTS TO THE CLAIMS UNDER PCT ARTICLE 19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47
56
REVENDEICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 16 avril 1997 (16.04.97);
revendication 28 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

- 5 26. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.
- 10 27. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, pour la détection d'anomalies chromosomiques.
- 15 28. Méthode de diagnostic *IN VITRO* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- 20 - la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 18 à 23 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
- 25 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.
29. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13 pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DOCUMENT PROCESSING
JUN 4 1998
98 JUN -4 PM 4:35

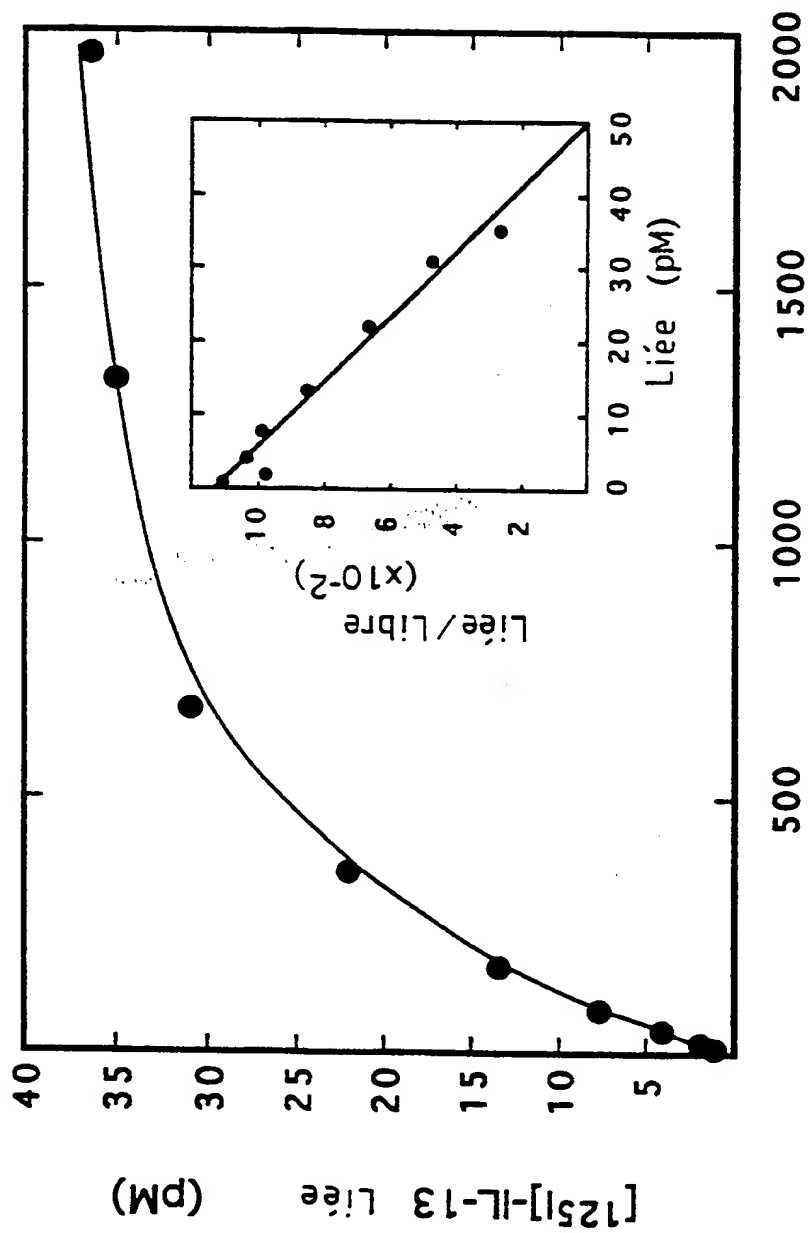
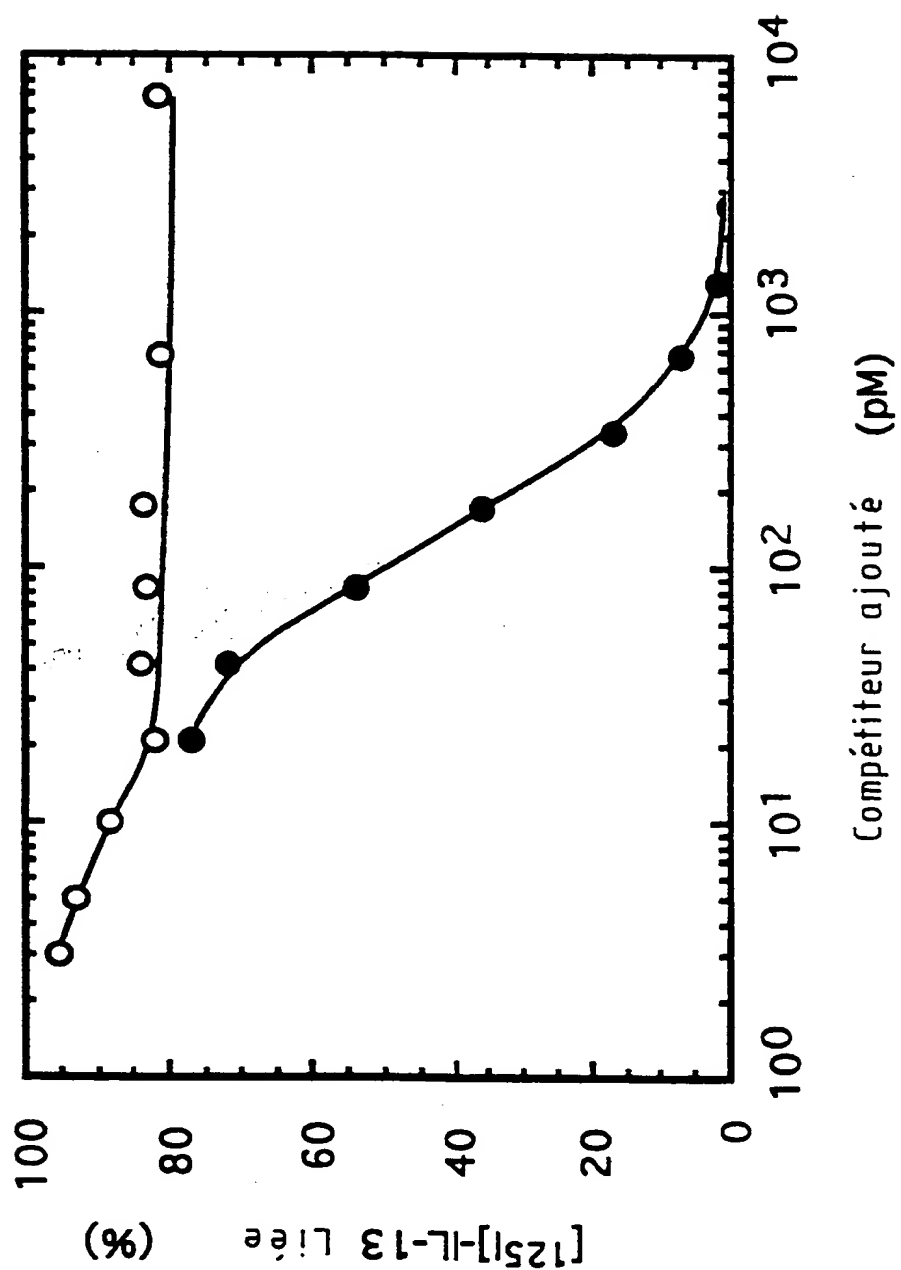
 $[^{125}\text{I}]\text{-IL-13 (pM)}$

FIG. 1a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG.1b

THIS PAGE BLANK (USPTO).

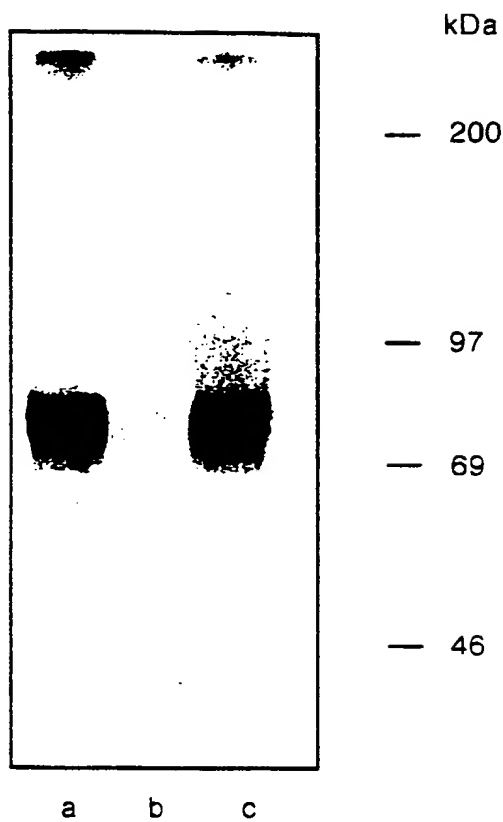


FIG.1c

THIS PAGE BLANK (USPTO)

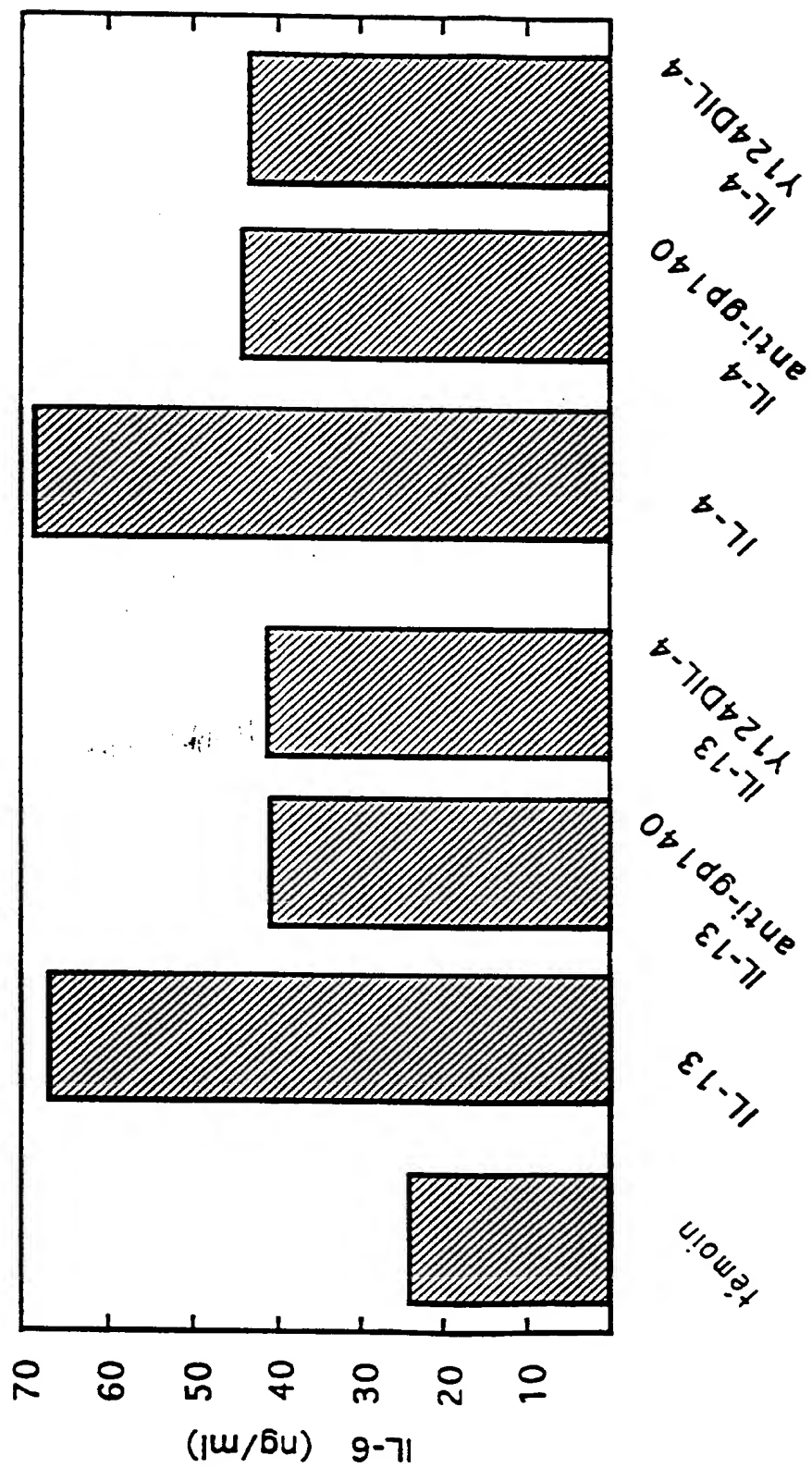


FIG.1d

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1	GGTGCTGTGCGCGGGGAGAGAGGCAATATCAAGGTTTTAAATCTCGGAGAAATGGCT	58
1		2
59	TTCGTTTGCTTGCTATCGGATGCTTATATACCTTTCTGATAAGCACAAACATTTGGCTGT	118
3	PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCGAGATAAAAGTTAACCTCCTCAGGATTTTGAGATAGTGGAT	178
23	ThrSerSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp	42
179	CCCGGATACTTAGGTTATCTCTATTGCAATGGCAACCCCACTGTCTCTGGATCATTTT	238
43	ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe	62
239	AAGGAATGCACAGTGGAAATGAACATAAATACCGAAACATTTGGTAGTGAAACATGGAAG	298
63	LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys	82
299	ACCATCATTAAGAATCTACATTACAAAGATGGGTTTGATCTTAACAAGGGCATTGAA	358
83	ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu	102
359	GCGAAGATACACACGCTTTTACCATGGCAATGCACAAATGGATCAGAAGTTCAAAGTTCC	418
103	AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer	122
419	TGGGCAGAACTACTATTGGATATCACCACAAAGGAATTCAGAAACTAAAGTTCAGGAT	478
123	TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp	142
479	ATGGATTGCGTATATTACAATTGGCAATATTACTCTGTCTTGGAAACCTGGCATAGGT	538
143	MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly	162
539	GTACTTCTTGATACCAATTACAACCTGTTTACTGGTATGAGGGCTTGATCATGCATTA	598
163	ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu	182
599	CAGTGTGTTGATTACATCAAGGCTGATGGACAAAATATAGGATGCAGATTTCCCTATTG	658
183	GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu	202

FIG. 2a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

659	GAGGCATCAGACTATAAGATTTC	TATATTTGTGTTAATGGATCATCAGAGA	CAAGCCT	718
203	GluAlaSerAspTyrLysAspPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro			222
719	ATCAGATCCAGTTATTTCACCTTTT	CAGCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCG	CCAGTC	778
223	IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProVal			242
779	TATCTTACTTTTACTCGGGAGAGTT	TCATGTGAAATTAAGCTGAAATGGAGCATACCTTTG		838
243	TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTrpSerIleProLeu			262
839	GGACCTATTCCAGCAAGGTGTTT	GATTGAAATTGAGATCAGAGAAGATGATACTACC		898
263	GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspThrThr			282
899	TTGGTGACTGCTACAGTTGAA	AATGAAACATACACCTTGAAACAAACAATGAAACCCGA		958
283	LeuValThrAlaThrValGluAsnGluThrTyrThrLeuLysThrThrAsnGluThrArg			302
959	CAATTATGCTTTGTAGTAAGAAGCA	AAAGTGAATATTTATTGCTCAGATGACGGAATTTGG		1018
303	GlnLeuCysPheValValArgSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTrp			322
1019	AGTGAGTGGAGTGATAACAATGCT	GGGAGGTGAAGACCTATCGAAGAAAACTTTGCTA		1078
323	SerGluTrpSerAspLysGlnCysTrpGluGlyGluAspLeuSerLysLysThrLeuLeu			342
1079	CGTTTCTGGCTACCATTTGGTTT	CATCTTAATATTAGTTATATTTGTAACCGGCTGCTT		1138
343	ArgPheTrpLeuProPheGlyPheIleLeuIleLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu			362
1139	TTGCGTAAGCCAAACACCTACCC	AAAAATGATTCAGAAATTTTCTGTGATACATGAAGA		1198
363	LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr			381
1199	CTTTCCATATCAAGAGACATGGT	TATTGACTCAACAGTTTCCAGTCATGCCCAAATGTTCA		1258
1259	ATATGAGTCTCAATAAACTGAATTTT	TCTTCCGAATGTTG	1298	

FIG. 2a (suite)

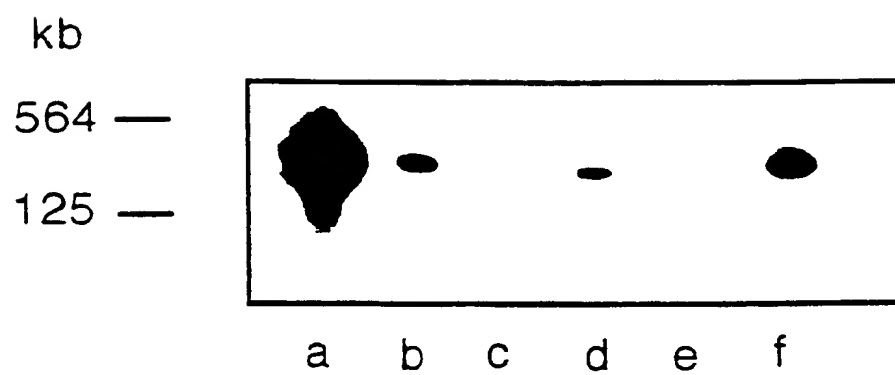
THIS PAGE BLANK (USPTO)

IL13R	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLEY 50
IL5R	..MIIVAHVLLILLGATEILQADLLPDEKISLLPVPVFTIKVTG.LAQVL 47
IL13R	LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLHYKDGFDLNKG 100
IL5R	LQWKPNPDQEQ.RNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93
IL13R	TEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDQV.... 146
IL5R	FSASVRTILQ...NDHSLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTCTTNTT 139
IL13R	..YYNWQ.....YLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIK 189
IL5R	EDNYSRLRSYQVSLHCTWLVGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTE..EQEYSK 187
IL13R	AD.GQNIGORFP..YLEASDYKDFYICVNGSSSENKPIRSSYFTFQLQNIV 236
IL5R	DTLGRNIAQWFPPTFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237
IL13R	KPLPPVYLTFRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTA 286
IL5R	QINPPLNVTAEIEGT.RLSIQWEKPVSAFPFHCFDYEYVKIHNTNRNGYLQI 286
IL13R	TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDL 336
IL5R	EKLMTNAFISIIDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQ.PIYVGND 335
IL13R	SKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTGLLLRKPNTPKMP.....EF 376
IL5R	HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPPIPAKSNIKDL 385
IL13R	FCDT..... 380
IL5R	FVTTNYEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDSVF 420

FIG. 2b

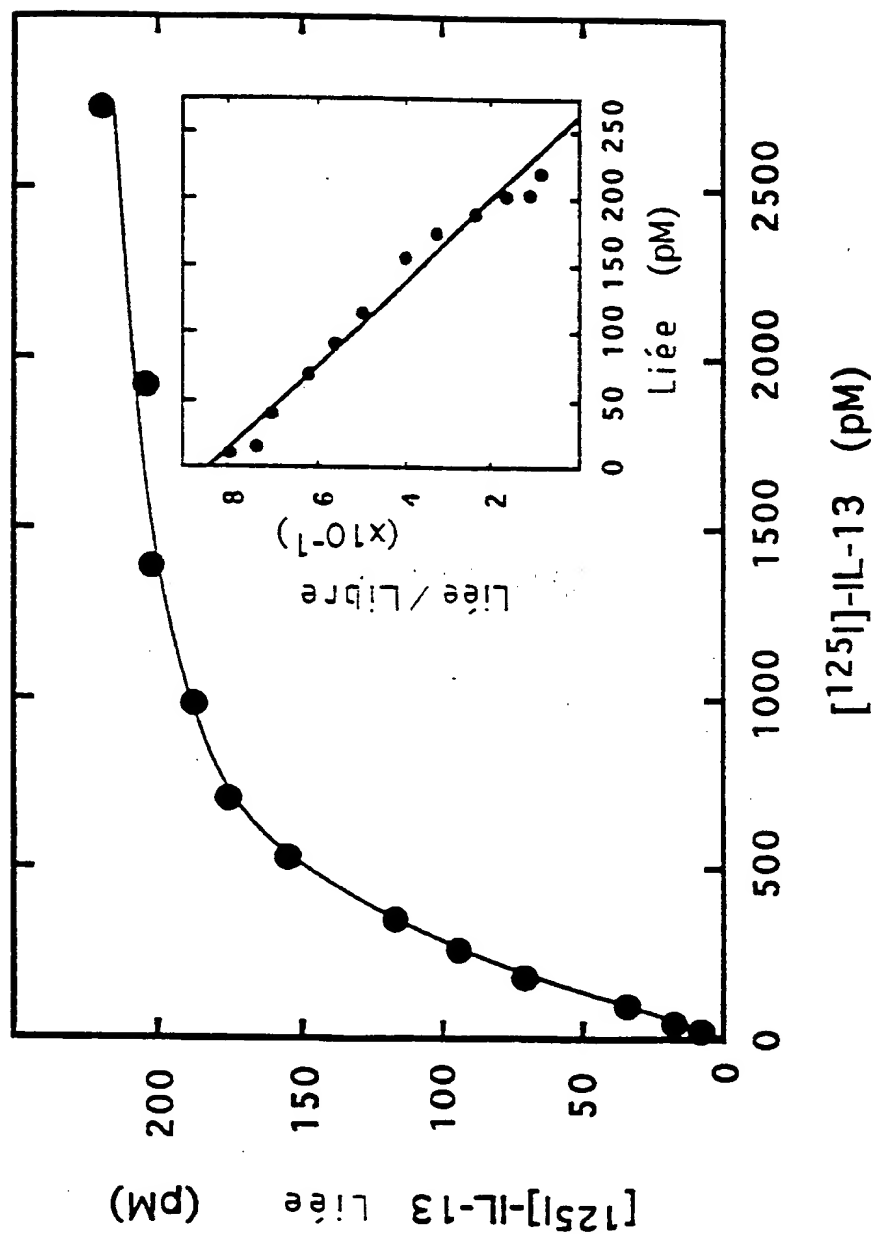
THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/19

FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/19

FIG. 4a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/19

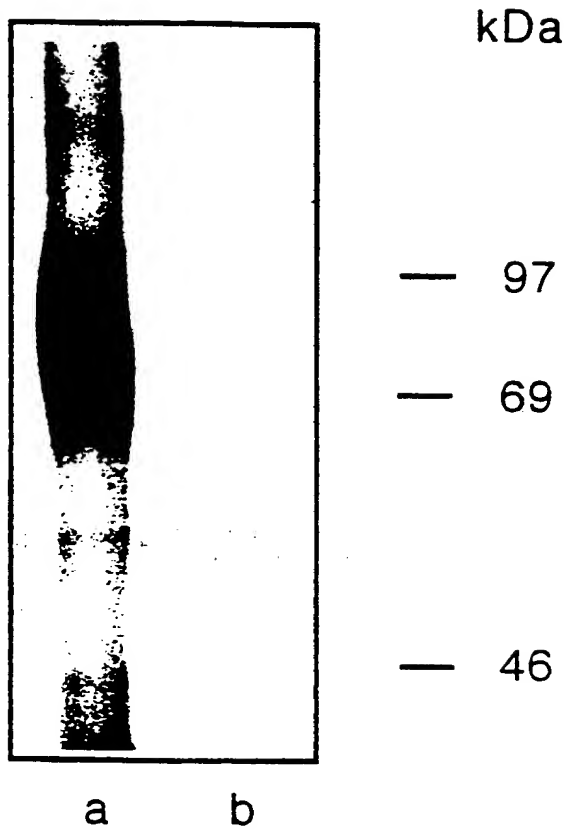


FIG. 4b

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/19

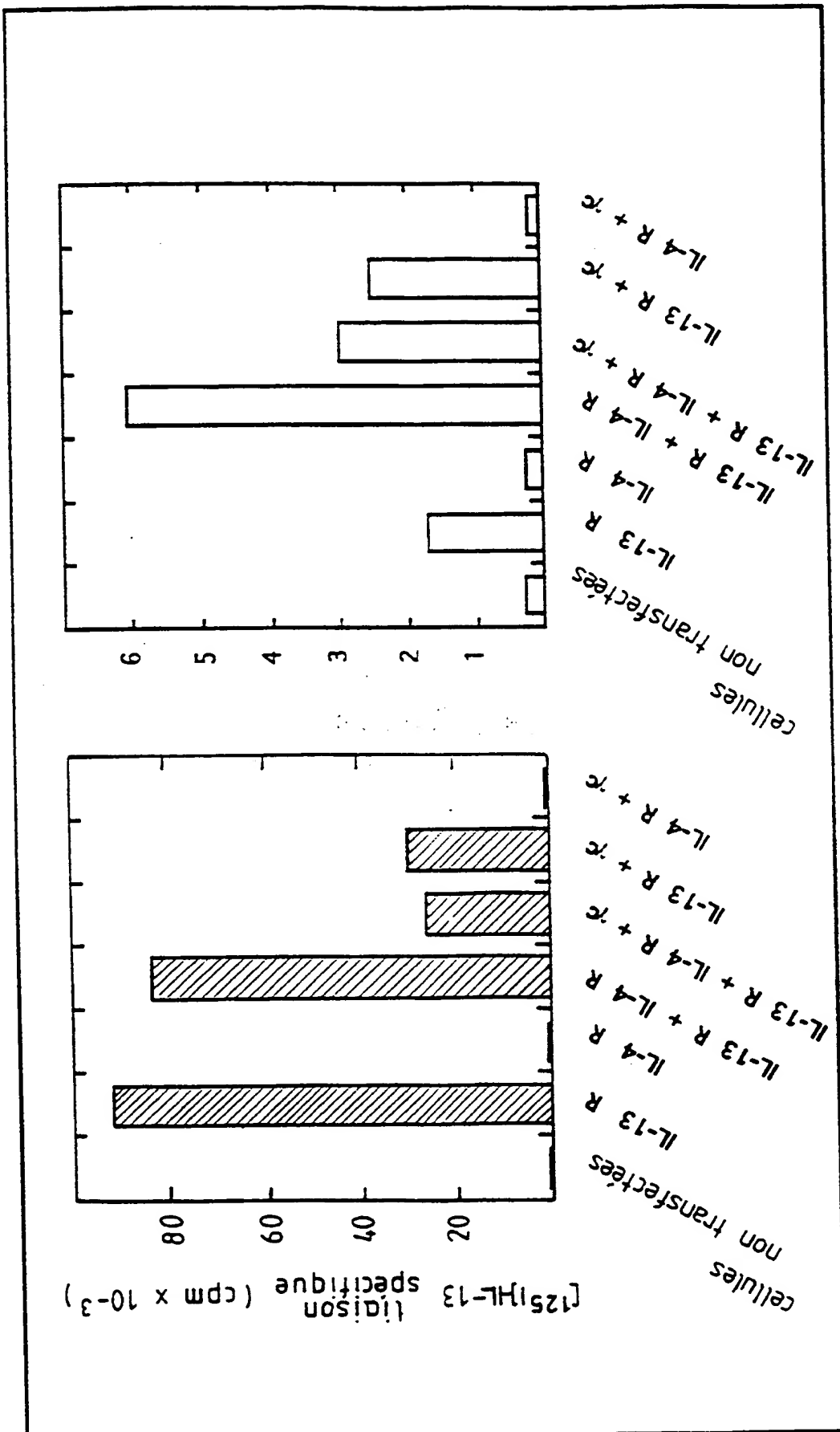


FIG.4C

THIS PAGE BLANK (USPTO)

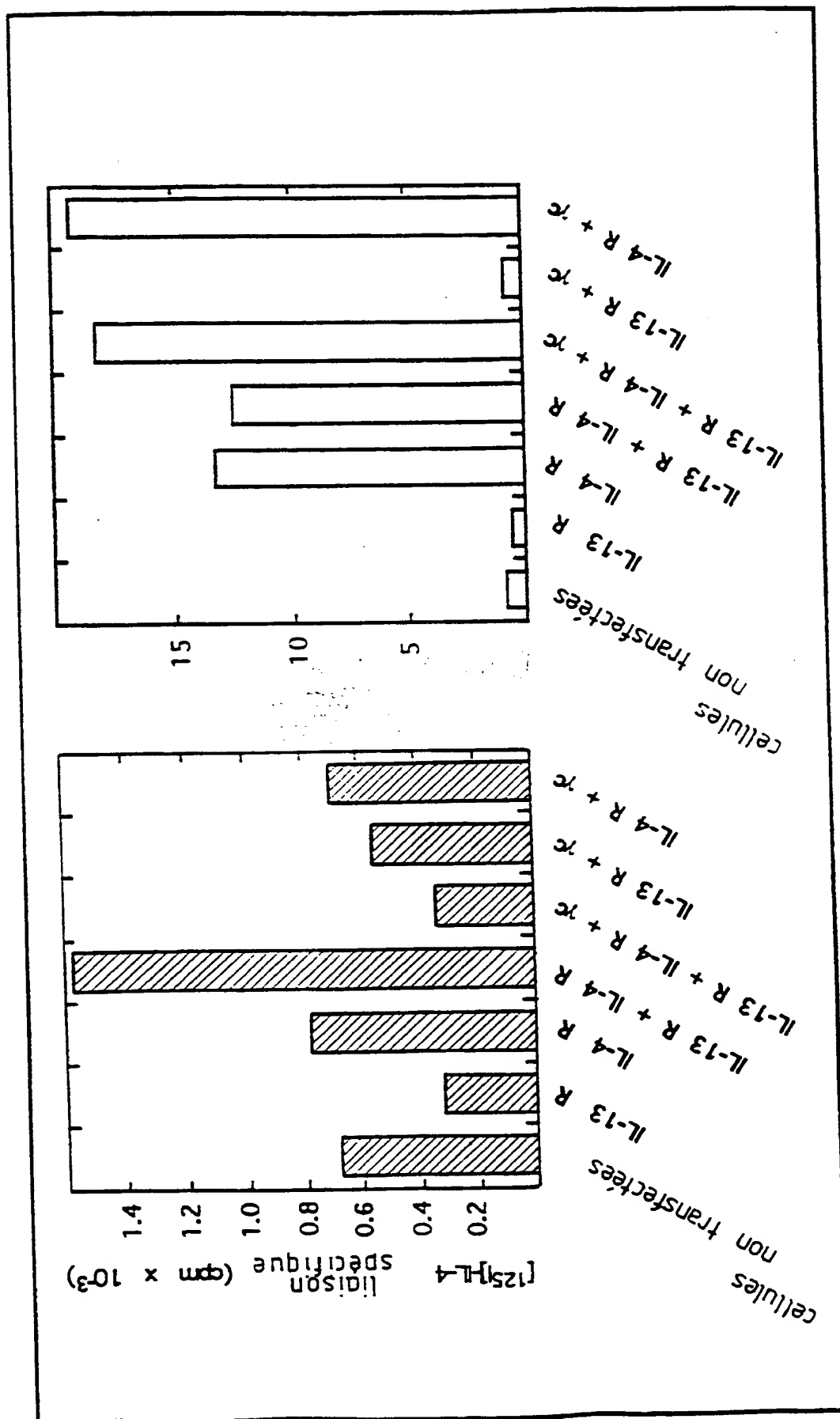


FIG.4d

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/19

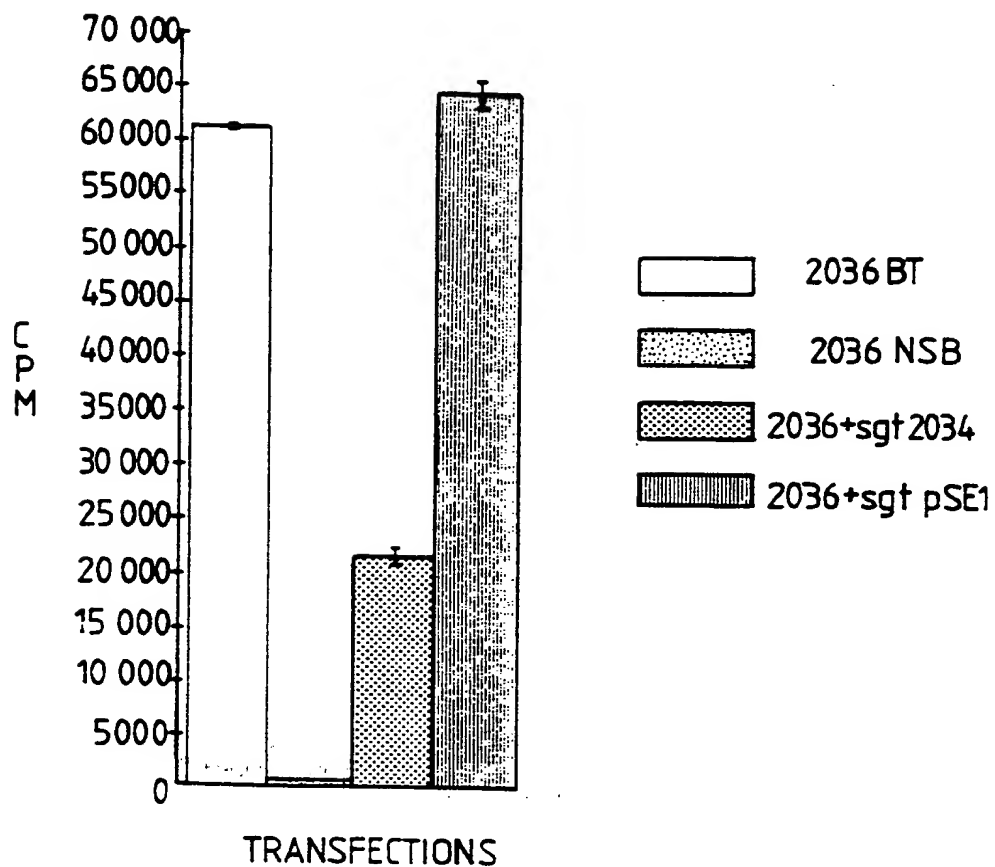
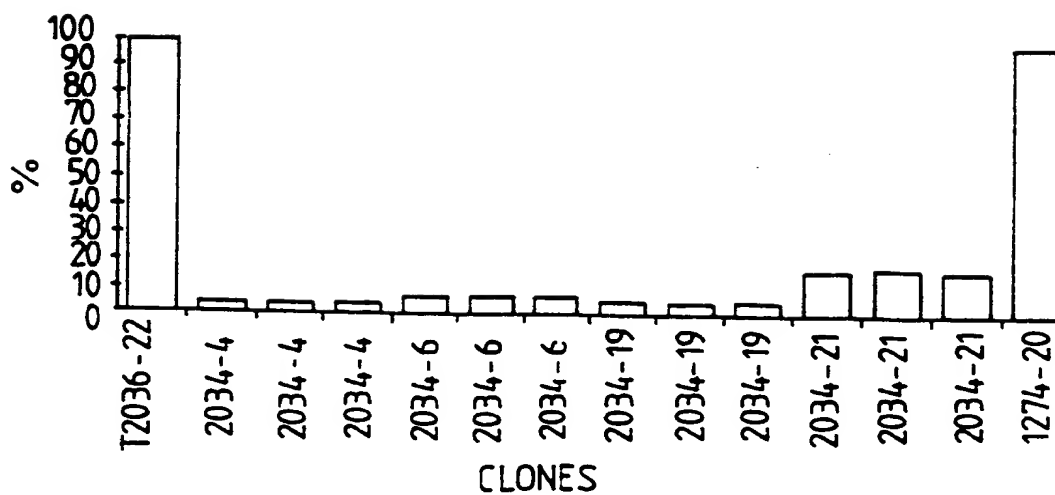


FIG. 5

FIG. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/19

1 TCAGCCCGGCGGGGCTCTGAGCGGAGAGGCTTCATGCACTTCGCGGGCGGGGCTCTCTCGGG
 -10 M E W P A R L C G 9
 61 CTGTGGGCGCTGCTGCTCTGCGCGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGCGCGCTACG 120
 10 L W A L L L C A G G G G G G G A A P T 29
 121 GAAACTCAGCCACCTGTGACAAATTTGAGTGTCTCTGTTGAAAACCTCTGCACAGTAATA 180
 30 E T Q P P V T N L S V S V E N L C T V I 49
 181 TGGACATGGAATCCACCCGAGGGAGCCAGCTCAAATTTGTAGTCTATGGTATTTTAGTCAT 240
 50 W T W N P P E G A S S N C S L W Y F S H 69
 241 TTTGGCGACAAACAAGATAAGAAAATAGCTCCGAAACTCGTCGTTCAATAGAAGTACCC 300
 70 F G D K Q D K K I A P E T R R S I E V P 89
 301 CCGAATGAGAGGATTTGTCTGCAAGTGGGGTCCCAGTGTAGCACCAATGAGAGTGAGAAG 360
 90 L N E R I C L Q V G S Q C S T N E S E K 109
 361 CCTAGCATTTTTGGTTGAAAAATGCATCTCACCCCCAGAGGTGATCCTGAGTCTGCTGTG 420
 110 P S I L L V E K C I S P P E G D P E S A V 129
 421 ACTGAGCTTCAATGCAATTTGGCACAACCTGAGCTACAGGAAGTGTCTTTGGCTCCCTGGA 480
 130 T E L Q C I W H N L S F M K C S W L P G 149
 481 AGGAATACCAGTCCCGACACTAACTATACTCTCTACTATTGGCACAGAAGCCTGGAAAAA 540
 150 R N T S P D T N Y T L Y Y W H R S L E K 169
 541 ATTCATCAATGTGAAAACATCTTTAGAGAAGGCCAATACTTTGGTTGTTCTTTGATCTG 600
 170 I H Q C E N I F R E G Q Y F G C S F D L 189
 601 ACCAAAGTGAAGGATTCCAGTTTtGAACAACACAGTGTCCAAATAATGGTCAAGGATAAT 660
 190 T K V K D S S F E Q H S V Q I M V K D N 209
 661 GCAGGAAAAATTAACCATCCTTCAATATAGTGCCTTTAACTTCCCGTGTGAAACCTGAT 720
 210 A G K I K P S F N I V P L T S R V K P D 229
 721 CCTCCACATATTA AAAACCTCTCCTTCCACAATGATGACCTATATGTGCAATGGGAGAAT 780
 230 P P H I K N L S F H N D D L Y V Q W E N 249
 781 CCACAGAATTTTATTAGCAGATGCCTATTTTATGAAGTAGAAGTCAATAACAGCCAAACT 840
 250 P Q N F I S R C L F Y E V E V N N S Q I T 269
 841 GAGACACATAATGTTTCTACGTCCAAGAGGCTAAATGTGAGAATCCAGAATTTGAGAGA 900
 270 E T H N V F Y V Q E A K C E N P E F E R 289
 901 AATGTGGAGAATACATCTTGTTCATGGTCCCTGGTGTCTTCCTGATACTTTGAACACA 960
 290 N V E N T S C F M V P G V L P D T L N T 309
 961 GTCAGAATAAGAGTCAAAAACAAATAAGTTATGCTATGAGGATGACAACTCTGGAGTAAT 1020
 310 V R I R V K T N K L C Y E D D K L W S N 329
 1021 TGGAGCCAAGAAATGAGTATAGGTAAGAAGCGCAATTCCACACTCTACATAACCATGTTA 1080
 330 W S Q E M S I G K K R N S T L Y I T M L 349
 1081 CTCATTGTTCCAGTCATCGTCGAGGTGCAATCATAGTACTCCTGCTTTACCTAAAAAGG 1140
 350 L I V P V I V A G A I I V L L L Y L K R 369
 1141 CTCAAGATTATTATATTTCCCTCCAATTCCTGATCCTGGCAAGATTTTAAAGAAATGTTT 1200
 370 L K I I I F P P I P D P G K I F K E M F 389
 1201 GGAGACCAGAATGATGATACTCTGCACTGGAAGAAGTACGACATCTATGAGAAGCAAACC 1260
 390 G D Q N D D T L H W K K Y D I Y E K Q T 409
 1261 AAGGAGGAAACCGACTCTGTAGTGCTGATAGAAAACCTGAAGAAAGCCTCTCAGTGATGG 1320
 410 K E E T D S V V L I E N L K K A S Q * 429

FIG. 7a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

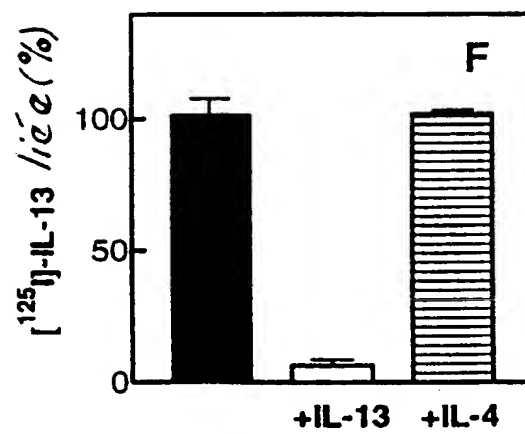
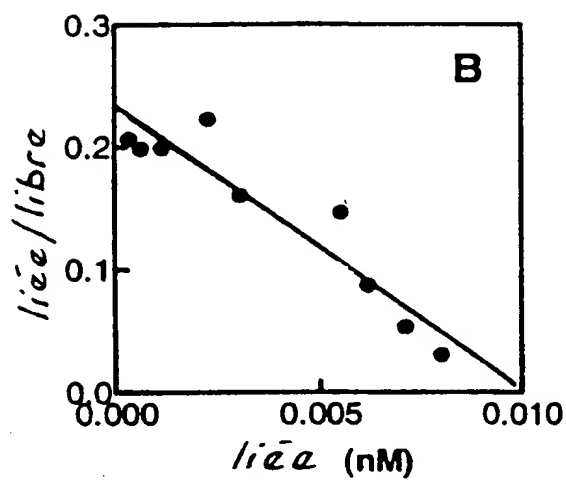
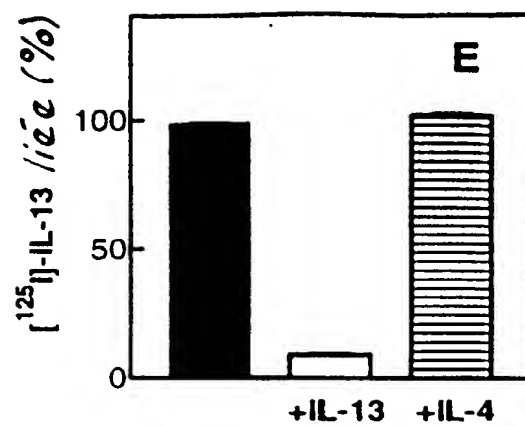
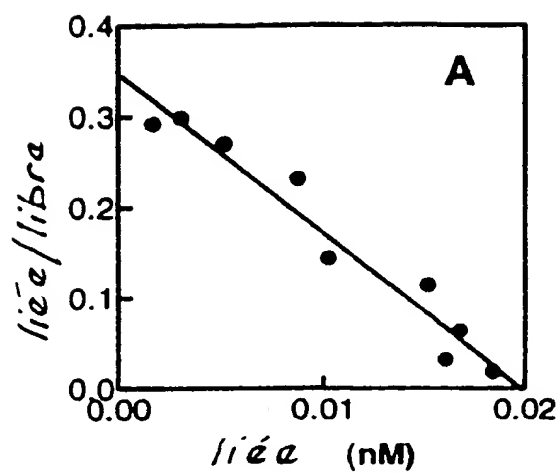
1381	TATCTGGGAAC TTATTAATGGAACTGAAACTAC TGCACCATTTAAAAACAGGCAGCTC	1440
1441	ATAAGAGCCACAGGTCTTTATGTTGAGTCGCGCACCGAAAACTAAAAATAATGGGCGCT	1500
1501	TTGGAGAAGAGTGTGGAGTCATTCTCAATTGAATTATAAAAGCCAGCAGGCTTCAAAC TAG	1560
1561	GGGACAAAGCAAAAAGTGATGATAGTGGTGGAGTTAATCTTATCAAGAGTTGTGACAACT	1620
1621	TCCTGAGGGATCTATACTTGCTTTGTGTTCTTTGTGTCAACATGAACAAATTTTATTTGT	1680
1681	AGGGGAAC TCATTTGGGGTGCAAATGCTAATGTCAAAC TTGAGTCACAAAGAACATGTAG	1740
1741	AAAACAAAATGGATAAAAATCTGATATGTATTGTTTGGGATCCTATTGAACCATGTTTGTG	1800
1801	GCTATTTAAAC TCCTTTAACAGTCTGGGCTGGGTCCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAG	1860
1861	CAATTTGGGAGTCCGAGGCGGGCGGATCACTCGAGGTGAGGAGTTCCAGACCAGCCTGAC	1920
1921	CAAAATGGTGAAACCTCCTCTCTACTAAAC TACAAAAATTAAC TGGGTGTGGTGGCGCG	1980
1981	TGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGTGAATTGTTTGAACCTGGGAGGT	2040
2041	GGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCACACCACTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGAC	2100
2101	TCTGTCTAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACCTCTTAATATTCTGGAGT	2160
2161	CATCATTTCCCTTCGACAGCA TTTTCCCTCTGCTTTGAAAGCCCCAGAAATCAGTGT TGGCC	2220
2221	ATGATGACAAC TACAGAAAAACCAGAGGCAGCTTCTTTGCCAAGACCTTTCAAAGCCATT	2280
2281	TTAGGCTGT TAGGGGCAGTGGAGGTGAATGACTCCTTGGGTATTAGAGTTTCAACCATG	2340
2341	AAGTCTCTAACAAATGTATTTCTTTCCCTCTGCTACTCAAGTAGCATTTACTGTGTCTTT	2400
2401	GGTTTGTGCTAGGCCCCCGGGTGTGAAGCACAGACCCCTTCCAGGGGTTTACAGTCTATC	2460
2461	TGAGACTCCTCAGTTCTTGCCACTTTTTTTTTTAAATCTCCACCAGTCATTTTTCAGACCT	2520
2521	TTTAACTCCTCAATTTCCAACACTGATTTCCCTTTTGCATTCTCCCTCCTTCCCTTCCTT	2580
2581	GTAGCCTTTTGACTTTTCATTGGAAATTAGGATGTAAATCTGCTCAGGAGACCTGGAGGAG	2640
2641	CAGAGGATAATTAGCATCTCAGGTTAAGTGTGAGTAATCTGAGAAACAATGACTAATTCT	2700
2701	TGCATATTTTGTAACTTCCATGTGAGGGTTTTCAGCATTGATATTTGTGCATTTTCTAAA	2760
2761	CAGAGATGAGGTGGTATCTTCACGTAGAACATTGGTATTCGCTTGAGAAAAAAGAATAG	2820
2821	TTGAACCTATTTCTCTTTCTTTTACAAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTTTCTCTGCCATAA	2880
2881	ATGATTAATTAAATAGCTTTTGTGTCTTACATTGGTAGCCAGCCAGCCAAGGCTCTGTTT	2940
2941	ATGCTTTTGGGGGGCATATATTGGGTTCATTCTCACCTATCCACACAACATATCCGTAT	3000
3001	ATATCCCCCTACTCTTACTTCCCCCAAATTTAAAGAAAGTATGGGAAATGAGAGGCATTT	3060
3061	CCCCCACCCTATTTCTCTCCTCACACACAGACTCATATTACTGGTAGGAAC TTGAGAACT	3120
3121	TTATTTCCAAGTTGTTCAAACATTTACCAATCATATTAATACAATGATGCTATTTGCAAT	3180
3181	TCCTGCTCCTAGGGGAGGGGAGATAAGAAACCCTCACTCTCTACAGGTTTGGGTACAAGT	3240
3241	GGCAACCTGCTTCCATGGCCGTGTAGAAGCATGGTGCCCTGGCTTCTCTGAGGAAGCTGG	3300
3301	GGTTCATGACAATGGCAGATGTAAAGTTATTCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGACAG	3360
3361	CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTTCTGCTGTTCTCTAGAAAGAATATTTGGTTTTCTCTGT	3420
3421	ATAGGAATGAGATTAATTCCTTTCCAGGTATTTTATAATTC TGGGAAGCAAAACCCATGC	3480
3481	CTCCCCCTAGCCATTTT TACTGTTATCCTATTTAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA	3540
3541	ATTCCCAACAAACATTGATGCTGACAGTCATGCAGTCTGGGAGTGGGGAAGTGATCTTTT	3600
3601	GTTCCCATCCTCTTCTTTTAGCAGTAAATAGCTGAGGGAAAAGGGAGGGAAAAGGAAGT	3660
3661	TATGGGAATACCTGTGGTGGTTGTGATCCCTAGGTCTTGGGAGCTCTTGGAGGTGTCTGT	3720
3721	ATCAGTGGAATTTCCCATCCCCCTGTGGGAAATTAGTAGGCTCATTTACTGTTTTAGGTCTA	3780
3781	GCCTATGTGGATTTTTTTCCTAACATACTAAGCAAACCCAGTGTCAGGATGGTAATTCTT	3840
3841	ATTCTTTTCGTTCAAGTTTTCCTTTCATCTGGGCACTGAAGGGATATGTGAAACAA	3900
3901	TGTTAACATTTTTTGGTAGTCTTCAACCAGGGATTGTTTCTGTTTAACTTCTTATAGGAAA	3960
3961	GCTTGAGTAAAAATAAATATTGTCTTTTTGTATGTCACCCAAAAAaaaa 4009	

FIG.7a(suite)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/19

FIG. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

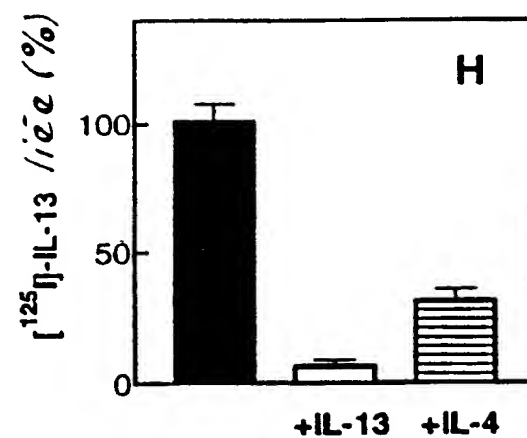
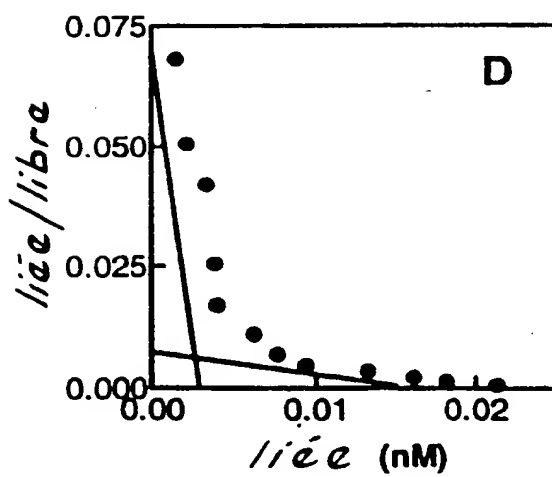
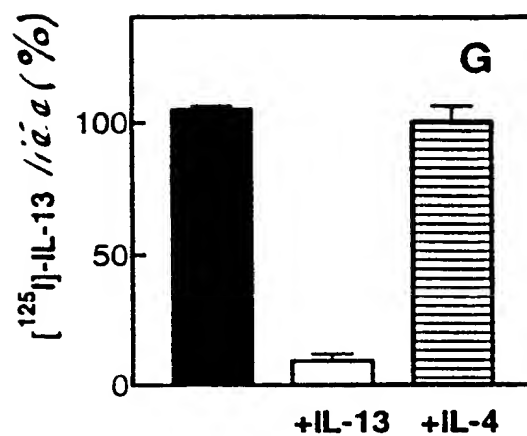
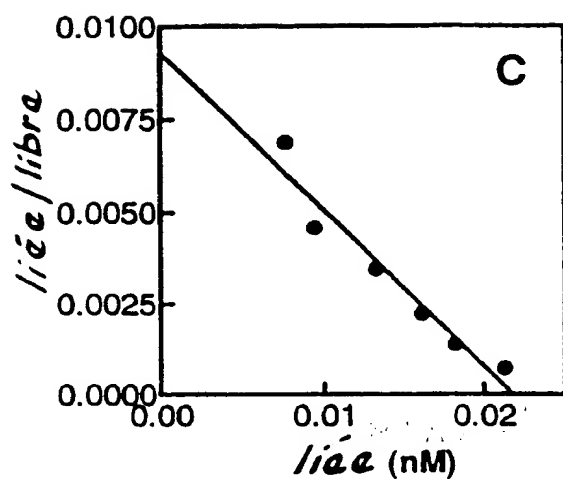


FIG.8 (suite)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<u>CHO</u>	<u>CHO-4</u>	<u>CHO-13</u>	<u>CHO-4-13</u>
4 13	4 13 c	4 13 c	4 13 c



FIG.9

09077817-091498

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 15/85, 5/10, C12Q 1/68, C12N 15/11, G01N 33/53, C07K 16/28, G01N 33/577, 33/68, A61K 38/17	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/20926 (43) Date de publication internationale: 12 juin 1997 (12.06.97)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01756

(22) Date de dépôt international: 7 novembre 1996 (07.11.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/14424 6 décembre 1995 (06.12.95) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SANOFI
(FR/FR); 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAPUT, Daniel
(FR/FR); La Bousquière, F-31290 Avignolet-Lauragais
(FR). FERRARA, Pascual (AR/FR); Libouille Saint-
Assise, F-31290 Avignolet-Lauragais (FR). LAURENT,
Patrick (FR/FR); Chemin Calmontais, "Clochettes",
F-31190 Autrive (FR). VITA, Natalio (IT/FR); 45 bis,
chemin Al-Cers, F-31450 Montgiscard (FR).(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place
d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU,
IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,
US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG),
brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avec revendications modifiées.

(54) Title: IL-13 RECEPTOR POLYPEPTIDE

(54) Titre: POLYPEPTIDE RECEPTEUR DE L'IL-13

(57) Abstract

A purified polypeptide including an amino acid sequence selected from (a) SEQ ID no. 2, and (b) any biologically active sequence derived from SEQ ID no. 2, is disclosed.

(57) Abrégé

Cette invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi: a) la séquence SEQ ID n°2, b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n°2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Polypeptide récepteur de l'IL-13

La présente invention concerne des polypeptides purifiés ayant une activité de récepteur spécifique de l'interleukine 13 (IL-13), leurs fragments biologiquement actifs et les séquences d'acides nucléiques correspondantes, et leurs applications.

L'IL-13 est une cytokine de 112 acides aminés récemment identifiée (1,2), secrétée
5 par des lymphocytes T activés, les lymphocytes B et les mastocytes après activation.

De par ses nombreuses propriétés biologiques communes avec l'IL-4, l'IL-13 a été décrite comme étant une cytokine "IL-4-like". Ses activités sont en effet similaires à celles de l'IL-4 sur les cellules B (3-5), les monocytes (6-10) et autres cellules
10 non hématopoïétiques (11-12). En revanche, contrairement à l'IL-4, elle n'exercerait pas d'effet particulier sur des cellules T au repos ou activées (13).

Les différentes activités biologiques de l'IL-13 sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et certains précurseurs hématopoïétiques ont été décrites en détail par A.J. Minty, ainsi que dans des articles de revues sur l'IL-13 (voir par ex. 14).
15 Plusieurs données indiquent en outre que cette cytokine a un effet pleiotrope sur d'autres types cellulaires. Ces cellules non-hématopoïétiques affectées directement par l'IL-13 sont des cellules endothéliales et microgliales, des kératinocytes, et des carcinomes de rein et de colon.

Les activités anti-inflammatoires et immunorégulatrices de l'IL-13 peuvent être
20 utiles par exemple dans le traitement des pathologies auto-immunes, tumorales et virales.

Une mise à profit de ces propriétés biologiques au plan clinique nécessite toutefois une parfaite connaissance des signaux et mécanismes par lesquels ces effets sont exercés, de façon à pouvoir les contrôler et les moduler dans les pathologies
25 concernées.

L'une des étapes dans l'analyse du signal transmis par une molécule biologique au sein d'une cellule, consiste à identifier son récepteur membranaire. Les travaux réalisés à cet effet sur le récepteur de l'IL-13 ont montré que l'IL-13 et l'IL-4 avaient en commun un récepteur, ou tout au moins certains des composants d'un

complexe récepteur, ainsi que des éléments de transduction de signaux (15-18). Ce récepteur est présent à la surface de différents types cellulaires, en nombre variable selon le type cellulaire considéré. La distribution comparative des récepteurs de l'IL-13 et de l'IL-4 a été indiquée par A.J. Minty (14).

- 5 Kondo et al. (19) ont décrit la structure d'un récepteur de haute affinité pour l'IL-4. Celui-ci est un dimère, formé par l'association d'une glycoprotéine de 140 kDa (IL-4R) et de la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 (γc). L'IL-4 peut se lier à la sous-unité glycoprotéique de 140 kDa (IL-4R ou gp 140) avec une bonne affinité (Kd comprise entre 50 et 100 pM) (15). Cependant, cette affinité est augmentée d'un
- 10 facteur 2 à 3, lorsque la chaîne γc est associée à la gp 140. Cette association est en outre nécessaire à la transmission de certains signaux médiés par l'IL-4 (19,20).

- Des expériences de compétition croisée pour la liaison, soit de l'IL-13, soit de l'IL-4, ont démontré que l'IL-4 peut normalement empêcher la liaison de l'IL-13, alors
- 15 que l'IL-13 ne peut généralement empêcher que partiellement la liaison de l'IL-4 à son récepteur (17,21), et ne se fixe sur aucune des deux sous-unités du récepteur de l'IL-4, ni sur le complexe formé par leur association. Sur la base de ces observations, les auteurs de la présente invention ont supposé que le récepteur spécifique de l'IL-13 était constitué du complexe récepteur IL-4 associé avec un
- 20 autre composant liant l'IL-13, (IL-13R β).

- Des travaux réalisés sur une lignée cellulaire érythroleucémique capable de proliférer en réponse à l'IL-13 et à l'IL-4 (lignée TF-1), leur ont permis de montrer que ces deux cytokines produisaient des événements intracellulaires similaires après fixation sur leur récepteur (18). En parallèle, des expériences de pontage
- 25 ("cross-link") leur ont permis de montrer que la gp 140 pouvait former des hétérodimères soit avec la chaîne γ , soit avec une nouvelle sous-unité, d'un poids moléculaire de 55 à 70 kDa (17,21).

D'autre part des travaux réalisés récemment sur une lignée de cellules souches embryonnaires de souris ont permis d'isoler l'ADN génomique et l'ADNc

encodant pour un polypeptide de 424 résidus d'acides aminés (IL-13R α), suggérant que le récepteur de l'IL-13 partageait avec le récepteur de l'IL-4 une chaîne commune pour constituer un récepteur à haute affinité (22,23), c'est-à-dire présente une affinité dont la constante Kd est située entre des valeurs comprises
5 entre 10 pM et 100 pM environ (un récepteur de basse affinité présentant une constante Kd située entre des valeurs comprises entre 2nM et 10 nM).

Compte tenu de l'importance au plan médical de la compréhension fine des phénomènes de régulation de l'IL-4 et de l'IL-13, et en particulier de la possibilité de pouvoir séparer et contrôler isolément les effets produits par l'une ou l'autre de
10 ces deux cytokines, les auteurs de la présente invention se sont intéressés, d'une part, à la caractérisation d'un polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une haute affinité et, d'autre part, à la caractérisation d'un autre polypeptide qui, seul, lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité pour l'IL-13.

15 Ceux-ci ont à présent identifié une lignée cellulaire de carcinome humain exprimant le récepteur spécifique de l'IL-13 en quantité plus importante que d'autres lignées de carcinome rénal humaines connues (21), et ont réalisé le clonage de la sous-unité primaire responsable de la fixation de l'IL-13 sur le récepteur de l'IL-4/IL-13, dénommée IL-13 R β , ainsi que le clonage de la chaîne commune que partage le
20 récepteur de l'IL-13 et le récepteur de l'IL-4 pour constituer un récepteur de haute affinité permettant une compétition croisée des 2 cytokines, dénommée IL-13R α .

La présente invention concerne donc des polypeptides purifiés liant spécifiquement l'IL-13.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet des polypeptides purifiés dont les
25 séquences d'acides aminés correspondent à celle d'un récepteur spécifique de l'IL-13 (IL-13R β et IL-13R α), ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci.

L'invention a également pour objet des séquences d'ADN isolées codant pour lesdits polypeptides ou leurs fragments biologiquement actifs.

Elle vise en outre les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, et les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression dans des conditions permettant la répllication et/ou l'expression de l'une desdites séquences nucléotidiques.

- 5 Les méthodes de production de l'IL-13R β et de l'IL-13R α recombinants ou de leurs fragments biologiquement actifs par les cellules hôtes transfectées font également partie de l'invention.

L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant l'IL-13R β ou/et l'IL-13R α ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci pour
10 la régulation des mécanismes immunologiques et inflammatoires produits par l'IL-13. Elle vise en outre une méthode pour l'identification d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , et l'utilisation de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou de fragments de ceux-ci pour le criblage de ces agents ainsi que pour la fabrication de nouveaux produits capables de moduler l'activité du
15 récepteur de l'IL-13.

L'invention comprend également des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

Elle vise enfin une méthode de traitement thérapeutique pour moduler les réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de
20 l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou d'un de leurs fragments biologiquement actif ou d'un composé capable de moduler spécifiquement l'activité de ce récepteur, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans la description de l'invention ci-après, on utilise les définitions suivantes :

- polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une haute affinité (IL-13R β) : un
25 polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif ;
- polypeptide qui, seul, lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité

(IL-13R α) : un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 4 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif ;

- biologiquement actif : capable de se lier spécifiquement à l'IL-13 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13, et/ou qui est reconnu par des anticorps spécifiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4, et/ou capable d'induire des anticorps qui reconnaissent le polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4 ;

- dérivé : tout polypeptide variant du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4, ou toute molécule résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2 ou de séquence SEQ ID n°4, c'est-à-dire obtenue par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'un seul ou d'un nombre limité d'acides aminés, ainsi que toute séquence isoforme, c'est-à-dire une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 ou à la séquence SEQ ID n°4, à l'un de leurs fragments ou à l'une de leurs séquences modifiées, contenant un ou plusieurs acides aminés sous la forme d'énantiomère D, lesdites séquences variantes, modifiées ou isoformes ayant conservé au moins l'une des propriétés les rendant biologiquement actives.

La présente invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

- a) la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID n°4,
- b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2 ou de SEQ ID n°4, selon la définition donnée précédemment.

La fabrication de dérivés peut avoir différents objectifs, dont en particulier celui d'augmenter l'affinité du récepteur pour l'IL-13, celui de moduler la compétition

croisée entre l'IL-13 et l'IL-4, celui d'améliorer leurs taux de production, d'augmenter leur résistance à des protéases, de modifier leur activité biologique ou de leur conférer de nouvelles propriétés pharmaceutiques et/ou biologiques.

Parmi des variants biologiquement actifs des polypeptides tels que définis
5 précédemment, on préfère les fragments produits par épissage alternatif des trans-
cripts (ARN messagers) du gène codant pour l'une des séquences d'acides aminés
décrites ci-dessus.

Dans une variante avantageuse, les 8 acides aminés C-terminaux du polypeptide
de séquence SEQ ID n° 2 sont substitués par les 6 acides aminés suivants :
10 VRCVTL.

Selon un autre aspect avantageux, l'invention vise une forme soluble de l'IL-13R β ,
dénommée IL-13R β s, comprenant notamment le domaine extra-cellulaire du
polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 s'étendant jusqu'au résidu 343 et
préférentiellement jusqu'au résidu 337 ainsi qu'une forme soluble de l'IL-13R α ,
15 dénommée IL-13R α s, comprenant notamment le domaine extracellulaire du
polypeptide de séquence ID n°4 s'étendant jusqu'au résidu 343 et
préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.

Le polypeptide qui comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID
20 n°4 représente un mode de réalisation particulier de l'invention. Comme cela
apparaîtra dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé à la surface de
cellules humaines pour former un récepteur de l'IL-13 fonctionnel ou s'associer
avec le récepteur de l'IL-4 pour former, avec la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 le
complexe récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13.

25 La présente invention a également pour objet une séquence d'acides nucléiques
isolée, choisie parmi:

- a) la séquence SEQ ID n° 1,
- b) la séquence SEQ ID n°3,

- 5 c) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 ou à la séquence SEQ ID n°3, ou à leurs séquences complémentaires et codant pour des polypeptides ayant une activité de récepteur de l'IL-13, ou permettant de reconstituer un récepteur de haute affinité pour l'IL-13 et l'IL-4,
- d) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) et c) du fait de la dégénérescence du code génétique.

10 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une séquence codant pour la partie soluble de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α et tout variant produit par épissage alternatif des transcripts de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α , conservant au moins une des propriétés biologiques décrites.

15 Un mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.

20 Un autre mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constitué par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n°1 jusqu'au nucléotide n° 1059, et préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre les numéros 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3.

Avantageusement, la séquence d'acides nucléiques selon l'invention est une séquence codant pour une protéine correspondant à la forme mature de l'IL-13R β ou de l'IL-13R α , cette protéine mature étant le résultat de la libération du peptide signal.

25 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n°3. De telles banques peuvent

être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

5 Ces séquences nucléotidiques permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, codant pour un polypeptide selon l'invention ou un fragment biologiquement actif de celui-ci. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de préférence à des conditions de température comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 30°C) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 10°C) (forte stringence), T_m étant la température de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent. De telles sondes font également partie de l'invention.

15 Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par des expériences d'hybridation, de transcrits spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

20 Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de SEQ ID n°3 ou de leur brin complémentaire.

Parmi les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à 15 nucléotides, les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier.

25 Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic *IN VITRO* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génétique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un polypeptide récepteur de l'IL-13 ou un fragment biologiquement actif, sont incluses dans la présente invention. Un tel type de méthode comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique de l'invention avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
- la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

Les sondes d'ADNc de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acides nucléiques, y compris un ARN messager, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides récepteurs de l'IL-13, tels que définis précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour l'IL-13R β ou l'IL-13R α au niveau du transcript.

Elles sont plus particulièrement utilisables dans le traitement des allergies et de l'inflammation.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants ayant une activité de récepteur de l'IL-13, tels que précédemment définis.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques
5 définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence nucléotidique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. L'hôte cellulaire utilisé peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple les levures, cellules d'insectes,
10 CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible dans le commerce. Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est constitué par la lignée fibroblastique COS-7 ou COS-3.

Les signaux contrôlant l'expression des polypeptides, tels que les promoteurs, les
15 activateurs ou les séquences de terminaison, sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant
20 peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus font également partie de la présente invention.

Dans le cas des cellules COS-7 ou COS-3 la transfection peut être réalisée à partir
25 du vecteur pSE-1, comme décrit dans (17).

L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus,

puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4 ou dérivée, méthode elle-même comprise dans la présente invention, et caractérisée en ce que l'on cultive les
5 cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4, ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le
10 polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques.

Les anticorps mono- ou polyclonaux capables de reconnaître spécifiquement l'IL-
15 13R β ou/et l'IL-13R α selon la définition donnée précédemment font également partie de l'invention. Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre l'IL-13R β ou/et l'IL-13R α selon les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de
20 culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497). Des anticorps avantageux sont des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

Les anticorps selon l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se
25 présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif. Ces immunotoxines peuvent dans ce cas constituer des agents thérapeutiques utilisables pour le traitement de certaines pathologies impliquant une surexpression de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

Les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés pour l'analyse par immunocytochimie des récepteurs de l'IL-13 sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, par marquage à l'or, ou à la peroxydase.

- 5 Ils peuvent ainsi être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α doit être observée comme par exemple une surexpression anormale ou le suivi de la régulation de l'expression membranaire.

- 10 L'invention concerne donc également un procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps de l'invention avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques
- 15 spécifiques entre l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

- L'invention concerne également un kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α dans un prélèvement biologique ou/et pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans
- 20 ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , éventuellement fixé sur un support,
 - des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α et ledit anticorps et/ou des moyens
- 25 de quantification de ces complexes.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode pour l'identification et/ou l'isolement de ligands spécifiques de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α ou d'agents capables de moduler son activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un

composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur de l'IL-13 et ledit composé, dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le récepteur, et en ce
5 que l'on détecte et/ou isole les composés liés à l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α , ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

Dans un mode particulier, cette méthode de l'invention est adaptée à l'identification et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'IL-13 pour son récepteur l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α .

10 L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un polypeptide répondant aux définitions précédentes, préférentiellement sous forme soluble, associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Un tel polypeptide peut en effet agir en compétition avec l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α exprimé à la surface cellulaire, et constituer de ce fait un antagoniste
15 spécifique de la liaison de l'IL-13 à son récepteur, qui peut avantageusement être mis en oeuvre pour la synthèse d'un médicament destiné à moduler les réactions médiées par l'IL-13 dans des situations pathologiques.

L'invention comprend enfin une méthode de traitement thérapeutique d'affections
20 liées à des réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de l'IL-13R β ou/et de l'IL-13R α (ou d'un de leurs fragments biologiquement actif), ou d'un composé capable d'en moduler spécifiquement l'activité biologique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la
25 description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : caractérisation du récepteur IL-13R β humain présent dans les cellules Caki-1.
- 5 a) analyse de Scatchard (cadre inséré) de la courbe de saturation de l'IL-13 marquée à l' [125 I] ;
- b) liaison de [125 I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr en présence de concentration croissante d'IL-13 non marquée (•) et d'IL-4 (o);
- c) expériences de pontage ("cross-link") en utilisant de l'IL-13 radioactive en
10 l'absence (coulée a) et en présence d'un excédent de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ou d'IL-4 (coulée c) ;
- d) inhibition de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-13 et l'IL-4 en présence d'un anticorps monoclonal spécifique de la chaîne IL-4R et de l'antagoniste de IL-4, Y124DIL-4.
- 15
- Figure 2 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R β , et comparaison des séquences protéiques de l'IL-5R, l'IL-13R α murine et de l'IL-13R β .
- a) séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R β . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont indiqués en
20 italiques et ceux correspondant au domaine transmembranaire sont indiqués en caractères gras. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont soulignés ;
- b) alignement des acides aminés des séquences de l'IL-13R β et de l'IL-5R. Les séquences protéiques de l'IL-13R et IL-5R sont alignées comme décrit
25 précédemment (24). Les résidus cystéine et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.
- Figure 3 : Profils d'expression de l'ARNm de l'IL-13R β .

L'ARN a été préparé à partir des cellules suivantes : Caki-1 (coulée a), A431 (coulée b), TF-1 (coulée c), U937 (coulée d), Jurkat (coulée e) et IM9 (coulée f).

- Figure 4 : Caractérisation du récepteur IL-13R β recombinant de l'IL-13.

- 5 Les cellules COS-7 sont transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et utilisées pour :
- a) des études de liaison de l'IL-13 radiomarquée (cadre inséré), par analyse de Scatchard de la courbe de saturation;
 - b) des expériences de pontage en utilisant de l'IL-13 radiomarquée en absence (coulée a) et en présence d'un excès de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ;
 - 10 c-d) des expériences de cotransfection en utilisant l'IL-13R β cloné, l'IL-4R (gp140) et la chaîne γ suivies par la liaison de l'IL-13 radiomarquée (c) ou de l'IL-4 (d). Les colonnes noires et blanches représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 et de l'IL-4.

- 15 - Figure 5 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par la forme soluble du récepteur (IL-13R β s) en expression transitoire.

L'expression d'IL-13R β s dans le surnageant des cellules transfectées par 2034 est testée par inhibition de la liaison de l'IL-13 sur les cellules transfectées par l'IL-13R β (2036). Les surnageants sont testés bruts en les diluant de moitié dans le

20 ligand iodé.

2036 NSB : liaison non spécifique en présence d'un excès d'IL-13 non marquée

2036 BT : liaison totale sur cellules transfectées avec le 2036

2036 + sgt 2034 : liaison sur cellules transfectées avec le 2036 en présence de surnageant de cellules transfectées avec le 2034.

- 25 2036 + sgt pSE1 : contrôle

- Figure 6 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par la forme soluble du récepteur (IL-13R β s) sur des lignées stables.

T2036-22 : liaison totale sur le clone IL-13R β (2036-22) sans présence de surnageant de clone sécrétant l'IL-13R β s (référence 100 %)

2034-4

2034-6

5 2034-19 _ 4 clones IL-13R β s

2034-21

1274-20 : en présence de surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R β s (contrôle).

10 - Figure 7 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R α et comparaison des séquences protéiques de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin

15 a) Séquence nucléotique de l'ADNc de l'IL-13R α . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont soulignés par un trait pointillé et ceux correspondant au domaine transmembranaires sont soulignés par un double trait. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont encadrés.

20 b) Alignement des acides aminés de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin. Les séquences protéiques de l'IL-13R α humain et de l'IL-13R α murin sont alignés comme décrit précédemment (24). Les résidus cystéines et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.

- Figure 8 : Caractérisation du récepteur IL-13R α recombinant de l'IL-13.

25 Les cellules CHO ou COS-3 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α ou/et de l'IL-4R et utilisées pour :

a) des études de liaison de l'IL-13 marquée à l'iode 125, par analyse de Scatchard de la courbe de saturation avec des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β (figure A), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et l'ADNc de l'IL-

4R (figure B), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α (figure C) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α et l'ADNc de l'IL-4R (figure D).

b) des expériences de compétitions de liaisons de l' [¹²⁵I]-IL-13 sur des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β (figure E), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β et l'ADNc de l'IL-4R (figure F), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α (figure G) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α et l'ADNc de l'IL-4R (figure H). Les colonnes blanches et hachurées représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 radiomarquée en présence d'un excès (1000 fois plus) d'IL-13 ou d'IL-4, les colonnes noires représentent la liaison totale.

10

- Figure 9 : comparaison de la mobilité électrophorétique dans l'EMSA d'extraits cellulaires exprimant le récepteur de l'IL-4 seul (CHO-4), le récepteur de l'IL-13R α seul (CHO-13) ou les récepteurs combinés IL-13R α et IL-4R (CHO-4-13) après activation des cellules CHO en présence d'IL-4 ou d'IL-13 (4 ou 13), c

15 représentant le témoin non activé..

MATERIELS ET METHODES

Expériences de liaison et de pontage :

Les expériences de liaison et de pontage sont réalisées comme décrit pour
5 [¹²⁵I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr (17).

Induction de la sécrétion d'IL-6 :

Les cellules Caki-1 (ATCC HTB46) sont mises dans des plaques de 24 puits à une
densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/puits et après 3 jours de culture des monocouches
10 confluentes sont lavées trois fois avec du milieu DMEM sans sérum de veau foetal.
La stimulation des cellules Caki-1 est réalisée avec 30 ng/ml d'IL-4 ou d'IL-13 en
absence ou en présence de Y124DIL-4 ou d'un anticorps monoclonal anti-gp140.
La quantité d'IL-6 libérée dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation est
mesurée par une technique ELISA (Innotest, France).

15

Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R β humain :

L'ARN total a été extrait des cellules Caki-1 comme décrit précédemment (25).
L'ARN poly(A) est isolé des ARN totaux avec des billes magnétiques recouvertes
d'oligo(dT)₂₅ (Dyna). Une banque d'ADNc contenant $2 \cdot 10^5$ clones a été construite
20 en utilisant la procédure d'amorces adaptateurs (26) et le vecteur pSE-1 (27). La
stratégie de clonage pour l'expression qui a été utilisée a été décrite précédemment
(17).

Obtention de l'ADNc de l'IL-13R β humain :

25 Les échantillons d'ARN sont copiés avec la reverse transcriptase et soumis à une
PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant une amorce sens
correspondant à la séquence + 489 à + 490 et une amorce antisens correspondant
à + 52 à + 71 (la numération est faite sur la base de la séquence de l'ADNc
montrée sur la figure 2). Les produits amplifiés par PCR sont hybridés avec une

sonde complémentaire des séquences + 445 à + 461 de l'ADNc. Les marqueurs de taille sont indiqués à la gauche de la figure.

Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13 R α humain :

5

1) Préparation de la sonde IL-13 R α murin

a) Culture des cellules B9 (28)

Les cellules B9 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco) supplémenté de 10% de
10 sérum de veau foetal et 50 μ g / ml de gentamycine.

b) Préparation de l' ARN des cellules B9.

Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS (phosphate buffer saline,
référence 04104040-GIBCO-BRL). Après centrifugation 10 minutes à 1000 rpm,
15 le culot cellulaire est mis en suspension dans le tampon de lyse de composition
suivante : guanidine-thiocyanate 4M ; citrate de sodium 25 mM pH 7 ; sarcosyl
0.5% ; β 2-mercaptoéthanol 0.1 M.

La suspension est soniquée à l'aide d'un sonicateur ultra turax no 231256 (JANKE
et KUNDEL) à puissance maximale pendant une minute. On ajoute de l'acétate de
20 sodium pH 4 jusqu'à 0.2 M. La solution est extraite avec un volume d'un mélange
de phénol / chloroforme (v / v ; 5 / 1).

On précipite à - 20°C l'ARN contenu dans la phase aqueuse à l'aide d'un volume
d'isopropanol. Le culot est resuspendu dans le tampon de lyse. La solution est à
nouveau extraite avec un mélange phénol / chloroforme et l'ARN est précipité avec
25 de l'isopropanol. Après lavage du culot avec de l'éthanol 70% puis 100%, l'ARN
est resuspendu dans de l'eau.

c) Préparation de l'ADN complémentaire.

L'ADNc est préparé à partir de 5 µg d'ARN total en utilisant une amorce poly T12. On incube l'ARN total dans un volume de 30 µl de tampon : Tris HCl 50 mM pH 8.3, MgCl₂ 6 mM, DTT 10 mM, KCl 40 mM, contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates et 30 unités de Rnasin (Promega), une heure à 37 °C, puis 10 minutes à 50 °C, puis de nouveau 10 minutes à 37 °C, avec 200 unités de l'enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco-BRL référence 8064A). La réaction est interrompue en chauffant 10 minutes à 65 °C.

d) Amplification spécifique d'un fragment de l'ADNc du IL13R α de souris par la technique de PCR.

La polymérisation est réalisée avec 6 µl d'ADNc dans 50 µl final avec le tampon de composition suivante : Tris HCl 10mM pH 8.3, MgCl₂ 2.5 mM, KCl 50 mM, 4 dNTP 0.2 mm, 2 µg / ml de chacune des deux amorces nucléiques et de 2.5 u de TAQ ADN polymérase (Beckman). Les couples d'amorces ont été choisis sur la séquence publiée par Hilton (22).

Amorce sens : nucléotide 249 à 268

5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'

Amorce anti-sens : nucléotide 1256 à 1275

5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'

La réaction est réalisée durant 30 cycles 1 minute à 94°C, 1 minute à 58°C, 4 minutes à 72°C, suivi d'un dernier cycle de 10 minutes à 72°C.

e) Purification du produit d'amplification PCR.

Après migration sur un gel d'agarose 1% (Sigma) en tampon TAE (Tris HCl 40 mM, EDTA 1mM pH7.9) pendant 1 heure à 100 volts, le gel est coloré en présence de bromure d'ethidium à 1µg / ml dans le même tampon. La bande

correspondant au produit d'amplification (fragment d' ADNc de 1027 paires de bases (pB) de l'IL13R α) est extraite en utilisant un kit Glass Max (Gibco).

5 f) Préparation de la sonde.

25 ng du fragment de 1027 paires de bases (pB) d'ADNc purifié correspondant au récepteur IL-13R α de souris sont marqués au phosphore 32 avec le kit BRL " Random Primers DNA labelling systems " à une activité spécifique de 2.4×10^9 dpm / μ g ; alternativement, 100 ng sont marqués par Nick-translation en utilisant
10 le kit Boeringher à une activité spécifique de 4×10^8 dpm / μ g .

2) Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R α humain

a) Préparation de l'ARN total

L'ARN total a été extrait des cellules Caki1 comme décrit précédemment dans le
15 paragraphe 1b.

b) Purification de l' ARN messenger (fraction polyA+).

La purification de la fraction polyA+ de l' ARN est réalisée à l'aide du kit Dynabeads oligo (dT) 25 de DYNAL (référence 610.05) suivant le protocole
20 préconisé par le fabricant. Le principe est basé sur l'utilisation de billes polystyrène super-paramagnétique sur lesquelles est attaché un oligonucléotide poly (dT) 25. La fraction polyA+ est hybridée sur l'oligonucléotide (dT) 25 couplé aux billes que l'on piège sur un support magnétique.

25 c) Northern blot.

5 μ g d'ARN messenger poly A+ sont déposés sur gel dénaturant 8% formaldéhyde, 1% agarose en tampon MOPS (10mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM). Après migration et transfert sur membrane hybond N+ (Amersham) en tampon 20 X SSC, l'ARN est fixé en chauffant au four à 80°C sous vide. La membrane est alors préhybridée

2 heures à 42°C dans le tampon suivant : 1 M NaCl ; 30% formamide ; 1% SDS ;
5 X Denhart's ; 100 µg / ml d' ADN de sperme de saumon. Après 2 heures de
préhybridation, la membrane est hybridée dans le même tampon avec une
concentration de sonde IL-13Rα de souris préparée par "random priming" de 2.5
5 10⁶ dpm / ml, pendant 16 heures. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 30
minutes dans le tampon 2 x SSC 0.1% SDS à température ambiante puis pendant 2
heures à 50°C dans le même tampon. Après 4 jours d' exposition dans une cassette
(Molecular Dynamics), le northern blot est analysé à " l'Instant Imager "
(Molecular Dynamics). Un transcrit majoritaire de 4200 paires de bases (pB)
10 et un doublet de 1500 pB et 2000 pB sont détectés dans les cellules Caki1, U373
et U937.

Caractérisation des propriétés de l'IL-13Rβ et de l'IL-13Rα humain :

Les cellules COS-7 ou CHO sont transfectées dans des boîtes de Pétri comme
15 décrit précédemment (17). 24 heures plus tard, les cellules sont trypsinisées et
mises en culture dans des plaques de 24 puits à une densité de 8.10⁴ cellules/puits.
Après une culture de 48 heures à 37°C, les cellules sont utilisées pour des
expériences de liaison (des essais réalisés en triplicata montrent une variation de
moins de 10 %) avec de l'IL-13 iodée comme décrit (17). Pour la transfection, les
20 cellules COS-7 ou CHO ont été transfectées dans des plaques de 25 cm² en
utilisant 0,6 mg de différents plasmides. Après 24 heures, les monocouches cellu-
laires sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques à 12 puits à raison de
8.10⁴ cellules/puits. Trois jours plus tard, les expériences de liaison et de
compétition sont réalisées avec de l'IL-13 marquée et avec de l'IL-13 et/ou de
25 l'IL-4 non marquées. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences
réalisées indépendamment.

Comparaison des mobilités électrophorétiques dans l' "EMSA" des extraits
nucléiques de cellules exprimant l'IL-13Rα et/ou l'IL-4R humains :

2.10⁶ cellules CHO sont réparties dans des boîtes de Pétri de diamètre 10 cm. 24 heures plus tard, les cellules sont transfectées avec 6 µg d'ADN plasmide (34). Après 48 heures, les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes dans 3 ml de milieu avec ou sans IL-13 ou IL-4 à une concentration de 100 ng par ml. Les
5 cellules sont ensuite rincées deux fois avec un tampon PB5-0,5 mM d'EDTA puis resuspendues dans 1,2 ml de PB5. Les cellules sont ensuite centrifugées et les extraits cellulaires préparés comme décrit dans (35). Les EMSA sont ensuite réalisées comme décrit dans (36) avec de 10 à 20 µg d'extraits cellulaires et avec
10 une sonde oligonucléotidique radiomarquée au ³²P (50000-100000 cpm), sonde correspondant à l'élément Cε du promoteur Cε humain (37). La sonde oligonucléotidique synthétisée présente la séquence suivante :
5'-GATCCACTTCCCAAGAACAGA-3'.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

Analyse de l'expression de l' IL-13R β humain à la surface des cellules Caki-1

5 Il a récemment été découvert que des cellules de carcinome rénal humain exprimaient en plus des récepteurs communs à l'IL-4 et à l'IL-13, un large excès de récepteurs spécifiques de l'IL-13 (21). Sur la base de ces résultats, un échantillon de lignées cellulaires de carcinome humain a été étudié pour la fixation de l'IL-13 comme décrit précédemment (17). Une lignée particulière, Caki-1 (ATCC
10 HTB46), qui exprime un nombre particulièrement important de sites de liaisons pour l'IL-13, a été analysée plus en détail. Les courbes de Scatchard obtenues à partir d'expériences de saturation montrent la présence de sites de liaison avec une Kd de 446 ± 50 pM et une capacité de $7,2 \cdot 10^4$ récepteurs/cellule (figure 1a). Dans des expériences de compétition, l'IL-13 non marquée déplace totalement l'IL-13
15 marquée d'une façon dose dépendante, alors que l'IL-4 déplace avec une haute affinité environ 10 % de l'IL-13 marquée. Des concentrations plus importantes d'IL-4 (supérieures à 100 nM) ne déplacent pas les 90 % restants d'IL-13 liée (figure 1b).

20 Ces résultats sont en concordance avec l'existence de deux sites l'un partagé par les deux cytokines, l'autre spécifique de l'IL-13. Les expériences de pontage par affinité de l'IL-13 montrent un complexe d'environ 70 kDa, qui coïncide avec le complexe observé dans des expériences de pontage similaire avec l'IL-13 dans différents types cellulaires (17,21). L'IL-13 marquée est complètement déplacée du
25 complexe par l'IL-13 mais pas par l'IL-4, ce qui est accord avec les expériences de compétition (figure 1c).

EXEMPLE 2 :

Analyse de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-4 ou l'IL-13.

- Les auteurs de l'invention ont analysé la sécrétion induite par l'IL-4 ou l'IL-13 sur des cellules Caki-1. Les deux cytokines induisent la sécrétion de niveaux similaires d'IL-6, et la sécrétion est inhibée par des anticorps spécifiques de la chaîne α de l'IL-4R et par l'antagoniste Y124DIL-4 (figure 1d). Ceci suggère que les
- 5 récepteurs partagés par les deux cytokines dans les cellules Caki-1 sont responsables de l'induction de la sécrétion d'IL-6. Des résultats similaires sont observés quand la phosphorylation du complexe protéique IRS1/4PS (18) induite - par l'IL-4 et l'IL-13 est analysée en présence ou en absence d'anticorps anti-IL-4R et d'antagoniste de l'IL-4.
- 10 Ces résultats pris dans leur ensemble suggèrent que le complexe récepteur IL-4/IL-13 exprimé dans les cellules Caki est identique à ce qui avait été précédemment décrit et que la protéine liant l'IL-13 (IL-13R β) qui est surexprimée, est un composant du récepteur responsable de la reconnaissance de l'IL-13 dans un complexe fonctionnel qui inclut IL-4R.
- 15 Ces cellules ont donc été utilisées comme source d'ARN messenger pour le clonage de cette entité liant l'IL-13.

EXEMPLE 3 :

Clonage de la sous unité primaire du récepteur de l'IL-13 (IL-13R β)

- 20 La stratégie de clonage et d'expression qui a été utilisée a été précédemment décrite (17). Une banque d'ADNc contenant 2.10^5 clones recombinants a été construite (26) à partir des cellules Caki-1 . La banque a été divisée en lots de 1000 ADNc, dont l'ADN de chaque lot sous forme de plasmide a été introduit dans des cellules COS-7 (29). La liaison d'IL-13 marquée aux cellules COS-7
- 25 transfectées permet d'identifier les lots de clones codant un récepteur de l'IL-13. Les lots positifs ont été répartis et recriblés jusqu'à l'identification d'un clone unique capable de réaliser la synthèse d'une protéine de surface cellulaire apte à lier l'IL-13. Deux ADNc de l'IL-13R β indépendants ont été finalement isolés. La séquence nucléotidique complète de l'ADNc de l'IL-13R β et la séquence d'acides

aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 2a. L'ADNc a une longueur de 1298 bases en excluant la queue poly-A et a une courte région non traduite en 3' de 106 bases. Un signal canonique de polyadenylation AATAAA se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotides 53 et 1192 définit un polypeptide de 380 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal potentiel, un seul domaine transmembranaire et une courte queue intracytoplasmique.

4 sites de N-glycosylation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokine de type II (30) sont aussi présents, le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N-terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de la région extra cellulaire. La très courte séquence cytoplasmique pourrait expliquer pourquoi c'est seulement le complexe récepteur partagé par l'IL-4 et par l'IL-13 dans les cellules Caki qui transduit un signal dans la cellule.

Des études d'alignement démontrent des homologies avec la chaîne α de l'IL-5R humain (51 % de similarité et 27 % d'identité, figure 2b) et à un degré moindre, avec le récepteur de la prolactine. Il est intéressant de noter que le complexe IL-5R est constitué d'une chaîne α qui lie l'IL-5 mais qui a besoin d'une autre protéine, la chaîne β partagée avec les récepteurs de l'IL-3 et du GM-CSF, pour former un récepteur de haute affinité qui est capable de transduire un signal (31).

EXEMPLE 4 :

Détection des ARN messagers de l'IL-13R β humain dans différentes lignées cellulaires

De façon surprenante, dans les cellules Caki-1 des quantités similaires d'ARN messagers de l'IL-13R β et IL-4R sont détectées par des analyses de northern blot bien qu'un large excès d'IL-13R β soit exprimé. Cette observation suggère qu'il y a une plus forte traduction de cet ARNm par rapport au transcript de l'IL-4R et

explique l'absence de détection de l'ARNm de l'IL-13R β dans les lignées cellulaires exprimant un faible nombre de sites de liaison de l'IL-13. Des analyses par RT-PCR (figure 3) montrent que le transcript trouvé dans les cellules Caki-1 est aussi présent à des degrés inférieurs dans la lignée kératinocytaire A431, les cellules
5 prémyéloïdes TF-1, les cellules prémyocytiques U937, et la lignée cellulaire B IM9. Aucun transcript n'est détecté dans la lignée cellulaire T Jurkat ni dans la lignée cellulaire pré-B NALM6. Ces résultats sont en accord avec des études de liaison de l'IL-13 sur ces mêmes lignées précédemment décrites par les auteurs de la présente invention (17), et avec les cibles biologiques connues de l'IL-13.

10

EXEMPLE 5 :**Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R β humain**

Les cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13R β lient
15 spécifiquement l'IL-13 marquée. L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une Kd d'une valeur de 250 ± 30 pM et une capacité de liaison maximale de $5,6 \cdot 10^5$ récepteurs/cellule (figure 4a).

L'affinité du récepteur recombinant est en bon accord avec la valeur de Kd de 446 pM pour l'IL-13R β dans les cellules Caki-1 et pour ce qui a été décrit dans plu-
20 sieurs autres cellules (17). Donc, malgré l'homologie de séquence avec la chaîne α de l'IL-5R, le récepteur cloné se comporte différemment puisqu'il n'a pas besoin d'une seconde chaîne pour reconstituer un site de liaison de haute affinité.

Il est intéressant de noter que la protéine liant l'IL-15 récemment décrite possède de la même façon la caractéristique de lier avec une forte affinité l'IL-15, en
25 l'absence des deux autres composants du complexe IL-15R (32).

Dans des expériences de compétition, l'IL-13 est capable d'inhiber la liaison de l'IL-13 marquée au récepteur cloné, avec une constante d'inhibition (Ki) de $1,5 \pm 0,5$ nM, alors que l'IL-4 n'inhibe pas la liaison. La pharmacologie du récepteur cloné est donc similaire à celle de l'IL-13R β présent dans les cellules Caki-1. Des

expériences de pontage montrent une bande radiomarquée de 70 kDa. Cette bande a la même mobilité que celle observée dans les cellules Caki ainsi que dans d'autres cellules (17). Ce complexe correspond très probablement à la bande de 60-70 kDa observée en plus de la bande de 140 kDa de l'IL-4R dans les expériences de pontage réalisées avec l'IL-4 marquée. Ceci pourrait aussi suggérer qu'il existe une forte interaction entre les deux protéines dans le complexe récepteur fonctionnel. Les auteurs de la présente invention ont donc vérifié si l'IL-13R β et l'IL-4R interagissent dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur qui permet une compétition croisée des deux cytokines. Les résultats d'expérience de coexpression sont montrés dans la figure 4,c et d.

Il apparait clairement que l'expression des deux récepteurs soit isolée soit simultanée, résulte en un grand nombre de récepteurs qui reconnaissent spécifiquement l'une ou l'autre des deux cytokines. Toutefois, lorsqu'ils sont exprimés ensemble, un petit nombre de récepteurs (5 à 10 %) est capable de reconnaître les deux cytokines. La cotransfection de la chaîne γ c avec l'IL-4R et l'IL-13R β ne procure pas une augmentation dans le nombre de sites de liaison partagés. Ces résultats suggèrent que les chaînes de l'IL-13R β et IL-4R peuvent interagir l'une avec l'autre dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur pour lequel l'IL-13 et l'IL-4 peuvent être en compétition. Le faible pourcentage de récepteurs reconstitués est un argument en faveur de la présence d'une autre protéine (IL-13R α) en quantités limitantes dans les cellules COS, nécessaire pour la reconstitution du complexe récepteur auquel se lie en compétitivité l'IL-13 et l'IL-4.

Les résultats obtenus dans les expériences de transfection avec la chaîne γ c démontrent que cette protéine n'est pas le facteur limitant qui avait été suggéré auparavant (15). Cette conclusion est aussi supportée par l'absence d'ARN messager de γ c dans les cellules Caki-1 (21).

Une autre raison possible pour expliquer le faible nombre de récepteurs reconstitués est l'existence d'une stoechiométrie incorrecte des deux protéines dans

la membrane cellulaire. Toutefois, des cotransfections utilisant des quantités relatives différentes d'IL-4R et d'IL-13R β ne montrent pas de différence majeure dans le nombre de récepteurs reconstitués. La possibilité qu'il existe un autre IL-13R avec une plus forte capacité à interagir avec IL-4R, a été confirmée chez la

5 souris (22) et chez l'homme par l'isolement de l'ADNc de l'IL-13R α (cf. EXEMPLE 7). Il doit être noté que l'expression de γc améliore la liaison de l'IL-4 comme cela a été précédemment décrit (19) mais diminue la liaison de l'IL-13, suggérant une interaction complexe entre les différentes chaînes.

EXEMPLE 6 :**Etude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur membranaire par un récepteur sous forme soluble.**

On décrit les résultats en expression transitoire (figure 5) ou sur les lignées stables (figure 6).

Les deux séquences d'ADNc, codant pour l'IL-13R β et pour l'IL-13R β s sont insérées dans le vecteur p7055 à la place de l'ADNc de l'IL-2 (33). Les plasmides résultants sont nommés 2036 et 2034 respectivement.

10 a) Expression transitoire

Les cellules CHO sontensemencées en plaques 12 puits à $3 \cdot 10^5$ cellules/puits et transfectées le lendemain par la méthode DEAE-Dextran comme pour les cellules COS, soit avec le plasmide 2036 ou 2034, soit avec le plasmide pSE-1 vide comme témoin.

15 Les cellules sont cultivées pendant trois jours de façon à permettre une accumulation de l'IL-13R β s dans le surnageant des cellules transfectées avec le plasmide 2034 et une bonne expression de l'IL-13R β dans la membrane des cellules transfectées avec le plasmide 2036.

Le surnageant des cellules transfectées avec l'IL-13R β s (2034) ou le témoin négatif (pSE-1 vide) est alors prélevé et les cellules transfectées avec l'IL-13R α sont utilisées pour l'étude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13.

20 La liaison de l'IL-13 à la surface des CHO exprimant l'IL-13R β (2036) est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue
25 sur les cellules entières dans un volume final de 500 μ l avec 300 pM de radioligand, en triplicata.

b) Lignées stables

Deux lignées stables de CHO transformées sont obtenues par transfection avec les séquences codantes de l'IL-13R β complet (polypeptide de 380 résidus) ou de l'IL-13R β sous forme soluble (IL-13R β s, polypeptide tronqué, correspondant aux résidus 1 à 337 de l'IL-13R β). Ces séquences sont insérées dans le vecteur p 7055. Les cellules CHO-DHFR⁻ sont transfectées avec les plasmides 2036 (IL-13R β) et 2034 (IL-13R β s) et les clones recombinants sélectionnés comme décrit précédemment (33).

L'un des clones CHO-IL-13R β (CHO 2036) obtenus, présentant 2 à 5.10⁵ sites par cellule est ensemencé en plaque 12 puits à une densité de 10⁵ cellules par puits et les cellules sont utilisées deux jours après pour des expériences de liaison en présence ou non d'IL-13R β s.

Pour cela, les clones CHO-IL-13R β s (CHO 2034) sont ensemencés en boîtes de 6 cm, en triplicata à 5.10⁵ cellules par boîte. Après 3 jours d'accumulation dans le milieu de culture, le milieu (5 ml par boîte) est prélevé pour les études d'inhibition de liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β du clone CHO 2036. De la même façon, le surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R β soluble est prélevé.

La liaison de l'IL-13 à la surface du clone CHO 2036-22 est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand, ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarkée (NSB). La liaison s'effectue en triplicata, sur les cellules entières, dans un volume de 500 μ l avec 300 pM de radioligand.

Les histogrammes des figures 5 et 6 représentent l'inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R β par l'IL-13R β s. Une inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur peut s'observer sur plusieurs clones.

EXEMPLE 7**Clonage du récepteur IL13R α humain.**

a) Préparation de la banque d' ADNc à partir des ARN messagers polyA⁺ de cellules Caki1.

A partir de 0.5 µg d'ARN messenger polyA⁺, on prépare l'ADN complémentaire simple brin marqué au ³²P. dCTP (L'ADN complémentaire obtenu présente une activité spécifique de 3000 dpm/ng) avec l' amorce synthétique de séquence

5' < GATCCGGGGCCCTTTTTTTTTTTT <3'

dans un volume de 30 µl de tampon suivant :

Tris Hcl 50mM pH 8.3 , Mgcl₂ 6mM , DTT 10 mM , Kcl 40 mM , contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléiques triphosphates , 30 µCi de dCTP α³² P et 30 U de Rnasin (Proméga). Après une heure d'incubation à 37°C, puis 10 minutes à 50°C, puis de nouveau 10 minutes à 37°C, avec 200 unités de l' enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco -BRL), on ajoute 4 µl d'EDTA. La matrice ARN est ensuite dégradée en ajoutant 6 µl d' une solution de NaOH 2,

Afin d' éliminer l'amorce synthétique, on purifie l'ADN complémentaire sur une colonne de 1 ml de séphacryl S400 (Pharmacia), équilibrée dans du tampon TE. Les deux premières fractions radioactives sont regroupées et précipitées avec 1/10 de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2.5 volumes d'éthanol, ceci après une extraction au chloroforme. On allonge ensuite l'ADNc en 5' en ajoutant une "queue" homopolymérique de dG avec 20 unités de l' enzyme terminale transférase (Pharmacia 27073001). Puis, on incube dans 20 µl de tampon de composition suivante : Tris HCl 30 mM pH 7.6 ; chlorure de cobalt 1 mM ; acide cacodylique 140 mM ; DTT 0.1 mM ; dGTP 1mM, pendant 15 minutes à 37°C, puis on ajoute 2 µl d' EDTA 0.5 M. On retraits de nouveau à la soude sans chauffer , on repurifie sur colonne S400 , on extrait au chloroforme et on précipite à l' éthanol. Le culot est dissous dans 33 µl de tampon TE. L'étape suivante consiste à apparier le vecteur de clonage pT7T3-18 auquel on a préalablement ajouté une queue homopolymérique de dC après coupure par PstI,

l'ADNc et l' adaptateur. On met en présence l'ADNc (33 µl) avec 75 ng de vecteur pT7/T3-18 (5µl), 120 ng de l' adaptateur (1µ l) de séquence suivante (comprenant un site Apa1),

5' AAAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

- 5 10 µl d' une solution de NaCl 200 mM, et on incube pendant 5 minutes à 65°C puis on laisse refroidir le mélange réactionnel jusqu'à température ambiante. L' étape suivante consiste à ligaturer le vecteur de clonage et l'ADNc simple brin dans un volume réactionnel de 100 µl avec 32.5 unités de l' enzyme ADN ligase du phage T4 (Pharmacia) pendant une nuit à 15°C dans un tampon de composition :
- 10 Tris HCl 50 mM pH 7.5 ; MgCl₂ 10 mM , ATP 1mM. Les protéines sont ensuite éliminées par extraction au phénol suivie d'une extraction au chloroforme, puis on ajoute 1/10 de volume d'une solution d' acétate d' ammonium 10 mM et 2.5 volumes d' éthanol. On centrifuge, le culot est repris dans le tampon de composition Tris acétate 33 mM pH 7.9, acétate de potassium 62.5mM, acétate
- 15 de magnésium 1 mM et DTT 1mM ; le deuxième brin d' ADNc est synthétisé dans un volume de 30 µl avec 30 unités de l'enzyme ADN polymérase du phage T4 (Pharmacia) et un mélange de 1 mM des quatre désoxynucléotides triphosphates ainsi que deux unités de la protéine du gène 32 du phage T4 (Pharmacia) pendant une heure à 37°C. On extrait au phénol et on en élimine les traces en déposant sur
- 20 une colonne P10 (Biogel P10-200-400 mesh - référence 15011050 - Biorad). La dernière étape consiste à transformer des cellules *E . Coli* MC 1061 par électroporation de l'ADN recombinant à l' aide d' un appareil Biorad Gene Pulser utilisé à 2.5 kV dans les conditions prescrites par le fabricant, puis on cultive les bactéries pendant une heure dans du milieu LB de composition :
- 25 bactotryptone 10 g / l; extrait de levure 5 g / l; Nacl 10 g / l.
- On détermine le nombre de clones indépendants obtenus en étalant une dilution au 1/1000 ème de la transformation après une heure d' incubation sur une boîte de milieu LB additionné de 1.5 % d' agar (p/v) et de 100 µg / ml d' ampicilline' appelé par la suite milieu LB gélosé.

Le nombre de clones indépendants obtenus est de 1 million.

b) Criblage de la banque d' ADNc.

La totalité de la banque est étalée sur du milieu gélosé (boîtes de Pétri de diamètre
5 de 150 mm) revêtu de membranes Biodyne A (PALL référence BNNG 132).
Après une nuit à 37°C, les clones sont transférés par contact sur de nouvelles
membranes. Ces dernières sont traitées en les déposant sur du papier Wathman 3
MM inhibé des solutions suivantes : NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes
puis Tris HCl 0.5 M pH 8, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes. Après un traitement à
10 la protéinase K dans le tampon suivant : Tris HCl 10mM pH8, EDTA 10mM,
NaCl 50mM, SDS 0.1%, protéinase K 100µg/ml pendant 30 minutes à 37°C, les
membranes sont lavées abondamment dans du tampon 2 X SSC (sodium citrate
NaCl), puis séchées au four sous vide à 80°C pendant 20 minutes.

15 c) Préhybridation et hybridation des membranes.

Les membranes sont alors préhybridées 2 heures à 42°C dans le tampon suivant :
1 M NaCl ; 30% formamide ; 1% SDS ; 5 X Denhart's ; 100 µg/ml d' ADN de
sperme de saumon. Après les 2 heures de préhybridation, les membranes sont
hybridées dans le même tampon avec une concentration de sonde IL-13Rα de
20 souris préparée par " nick-translation" de $2.5 \cdot 10^6$ dpm/ml, pendant 16 heures
ensuite. Les membranes sont lavées 2 fois 30 minutes dans le tampon 2 x SSC
0.1% SDS à température ambiante puis 2 heures à 50°C dans le même tampon.
Après une nuit d' exposition à - 80°C en présence d' un film Kodak X-OMAT,
plusieurs clones positifs sont révélés.

25

d) Séquençage d' un clone IL-13Rα humain et analyse de la séquence.

La séquence est obtenue à l' aide du kit Applied Biosystem (référence 401628). La
séquence nucléique complète de l' ADNc de l' IL13Rα et la séquence d' acides
aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 7. L' ADNc a une longueur

de 3999 bases en excluant la queue de poly-A et possède une longue région 3' non traduite de 2145 bases.

Un signal canonique de polyadénylation se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotide 34 et 1851 définit un polypeptide de 427 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal
5 potentiel, et un seul domaine transmembranaire et une courte région intracytoplasmique.

10 sites de glycosilation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokines de type II sont aussi présents,
10 le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N- terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de région extracellulaire.

EXEMPLE 8

Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-3 ou CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R α humain.

Les cellules CHO transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13R α lient
5 spécifiquement l'IL-13 marquée.

L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une Kd d'une valeur de $4,5 \pm 0,4$ nM et une capacité de liaison maximale de 26000 récepteurs/cellule (fig. 8C et 8G).

10 Les résultats des expériences de co-expression sont montrés dans les figures 8D et 8H.

L'analyse des résultats de la figure 8C met en évidence que l'IL-13R α s'exprime bien dans le clone 2036 des cellules CHO. On peut noter que l'IL-4R déplace 60 % de la liaison de l'IL-13 dans les cellules CHO cotransfectées avec l'ADNc de
15 l'IL-4R et de l'IL-13R α (figure 8H) mais en tenant compte d'un Kd de 7,5 nM pour l'IL-13R α on aurait 10 fois plus de sites IL-13R α que de sites IL-4R.

Les cellules CHO-hIL4R (IL-4R α humain) exprimant l'hIL-4R transfectées avec l'ADNc codant pour l'hIL-13R α lient spécifiquement l'IL-13 marquée.

L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre clairement 2 sites
20 composants, l'un de haute affinité avec une Kd d'une valeur de $23 \pm 8,9$ pM et une capacité de liaison maximale de 28000 sites/cellule et, l'autre de basse affinité, avec une Kd d'une valeur de $4,2 \pm 1,4$ nM et une capacité de liaison maximale de 150000 sites/cellule (fig. 8D).

Le deuxième site caractérisé a la même affinité que l'hIL-13R α (IL-13R α humain)
25 exprimé seul et correspond aux chaînes IL-13R α non associées car exprimées en plus grande quantité que l'hIL-4R.

Ces récepteurs à haute affinité reconstitués en présence des 2 chaînes hIL-13R α et hIL-4R sont capables de reconnaître les 2 cytokines (fig. 8D et 8H).

Ceci est encore plus clair sur les cellules COS/pSE1 co-exprimant les 2 chaînes hIL-13R α et hIL-4R en quantité comparable où l'IL-4 déplace toute la liaison IL-13.

L'affinité de l'IL-13R α humain recombinant est comparable à celle décrite pour le
5 récepteur IL-13R α de souris (2-10nM) (ref. 22).

Contrairement à la chaîne hIL-13R β , précédemment décrite, l'IL-13R α humain ne constitue pas seul un site de liaison de haute affinité.

L'IL-13R α et l'IL-4R interagissent donc dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur à haute affinité.

10

EXEMPLE 9

15 **Activation de protéines STAT par l'IL-13 et l'IL-4 dans les cellules CHO co-exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R.**

Dans les cellules PBMC humaines, l'hIL-4 et l'IL-13 activent 2 tyrosine kinases de la famille des janus, Jak1 et Jak2 qui phosphorylent un facteur latent de transcription, STAT6. Ce facteur activé entre dans le noyau et se lie à des éléments spécifiques dans les promoteurs des gènes régulés par l'IL-4.

20 Nous avons choisi l'élément C ϵ du promoteur du C ϵ humain comme sonde dans un test de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) pour démontrer l'activation par l'IL-13 d'un facteur de liaison similaire à STAT6.

Les extraits nucléaires des cellules CHO, exprimant l'IL-13R seul, l'IL-4R seul, ou les 2 chaînes ensemble, stimulées avec 100ng/ml d'IL-13 ou d'IL-4 pendant 30mn à
25 37°C, sont incubés avec l'élément C ϵ radiomarké.

Les extraits nucléaires des cellules co-exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R seul, forment un complexe ayant la même mobilité dans l'EMSA que les cellules soient induites avec l'IL-4 ou l'IL-13 (cf. figure 9). Par contre, avec les cellules exprimant l'une ou l'autre chaîne seule, aucun complexe n'est détecté.

Dans les cellules CHO exprimant l'hIL-13R α et l'hIL-4R, l'IL-13 et l'IL-4 initient donc la même cascade de signalisation.

5 Le clonage de l'IL-13R β et de l'IL-13R α décrit ici permet d'améliorer la connaissance des facteurs intervenant dans les réponses spécifiquement induites par l'IL-13 par rapport aux réponses induites par l'IL-4. Il permet en outre de disposer d'un outil pour l'étude de la régulation de l'expression du récepteur dans des conditions normales et pathologiques où l'IL-13 joue un rôle clé.

10 Par ailleurs, la disponibilité de l'ADNc permet de faciliter le clonage d'autres protéines nécessaires pour la reconstitution d'un complexe récepteur IL-4/IL-13 et est également utile pour la fabrication ou la modélisation rationnelle de nouveaux médicaments capables d'être des antagonistes spécifiques des activités de l'IL-13.

REFERENCES :

1. Minty, A. *et al.*, Nature, 1993, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A , 1993, 90,
5 3735-3739.
3. Defrance, T. *et al.*, J Exp. Med., 1994, 179, 135-143.
4. Punnonen, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad.Sci. (USA), 1993, 90,
3730-3734.
5. Fior, R. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1994, 5, 593-600.
- 10 6. Muzio, M. R. F. *et al.*, Blood, 1994, 83, 1738-1743.
7. De Waal Malefyt, R. *et al.*, J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381.
8. Doyle, A. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1441-1445.
9. Montaner, L.J. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747.
10. Sozzani, P. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088.
- 15 11. Herbert, J.M. *et al.*, Febs Lett. , 1993, 328, 268-270.
12. Derocq, J.M. *et al.*, Febs Lett. 1994, 343, 32-36.
13. Zurawski, G. *et al.*, Immunol. Today, 1994, 15, 19-26.
14. Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease. Eds D.G.
Remick and J.S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996.
- 20 15. Zurawski S.M. *et al.*, Embo Journal, 1993, 12, 2663-2670.
16. Aversa, G. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218.
17. Vita, N. *et al.*, Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517.
18. Lefort, S. *et al.*, Febs Lett., 1995, 366, 122-126.
19. Kondo, M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1874-1883.
- 25 20. Russell, S.M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1880-1883.
21. Obiri, N. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 8797-8804.
22. Hilton, D.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 497-501.
23. Callard, R.E. *et al.*, Immunology Today, 1996, 17, 3, 108-110.
24. Devereux, J. *et al.*, Nucleic Acids Res., 1984, 12, 387-395.

25. Chomczynski, P. *et al.*, N. Anal. Biochem., 1987, 162, 156-159.
26. Caput, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1670-1674.
27. Minty, a. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1993, 4, 99-110
28. Labit Le Bouteiller, C. *et al.*, J. of Immunol. Methods, 1995, 181, 1, 29-36.
- 5 29. Seed, B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 3365-3369.
30. Bazan, J.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6934-6938.
31. Honjo, T. *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 1991, 1, 201-203.
32. Giri, J.G. *et al.*, Embo Journal, 1993, 14, 3654-3663.
33. Miloux, B. *et al.*, Gene, 1994, 149, 341-344.
- 10 34. Sampayrac, L. M. *et al.*, PNAS USA, 1981, 78, 7575-7578.
35. Jiang, S-W *et al.*, Nucleic Acid Res., 1995, 23, 3607-3608.
36. Köhler, I *et al.*, FEBS Letters, 1994, 345, 187-192.
37. Seidel., H.M. *et al.*, PNAS USA, 1995, 92, 3041-3045.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: SANOFI
(B) RUE: 32,34 rue MARBEUF
(C) VILLE: PARIS
(D) PROVINCE: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75374
(G) TELEPHONE: 0153774000
(H) TELECOPIE: 0153774133

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Il-13 recepteur

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1539 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens
(F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
(G) TYPE DE CELLULE: renal
(H) LIGNEE CELLULAIRE: caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGTGCCTGTC GCGGGGAGA GAGGCAATAT CAAGGTTTTA AATCTCGGAG AAATGGCTTA	60
ATTGCTTTGC TTGGCTATCG GATGCTTATA TACCTTTCTG ATAAGCACAA CATTTGGCTG	120
TACAAGCTTT TGCACCTCAT CTTCAGACAC CGAGATAAAA GTTAACCCTC CTCAGGATTT	180
TGAGATAGTG GATTATGAAG AGAACCCGGA TACTTAGGTT ATCTCTATTT GCAATGGCAA	240
CCCCCACTGT CTCTGGATCA TTTTGTGTTG TGAAAGGAAT GCACAGTGGA ATATGAACTA	300
AAATACCGAA ACATTGGTAG TGAAACATGG AAGGCTAGTG TAGAGGTTAC CATCATTACT	360
AAGAATCTAC ATTACAAAGA TGGGTTTGAT CTTAACAAGG GCATTGAATT ATAGAAGGGC	420
GAAGATACAC ACGCTTTTAC CATGGCAATG CACAAATGGA TCAGAAGTTC AAAGTTCCAA	480
TTGCTAGGAG TGGGCAGAAA CTACTTATTG GATATCACCA CAAGGAATTC CAGAACTAA	540
AGTTCAGGAT TAAGTTTGG GTAGAATGGA TTGCGTATAT TACAATTGGC AATATTTACT	600
CTGTTCTTGG AAACCTGGCA TAGGTTACAT TATGTCTGGG TACTTCTTGA TACCAATTAC	660
AACTTGTTTT ACTGGTATGA GGGCTTGGAT CATGCATTAA ATATATTTGG AAACAGTGTG	720
TTGATTACAT CAAGGCTGAT GGACAAAATA TAGGATGCAG ATTTCCCTAT TTGGCAATAA	780

```

AGGAGCAGTG AGGCATCAGA CTATAAAGAT TTCTATATTT GTGTTAATGG ATCATCAGAG      840
AACAAGCCTG AAATATCAAG GAATCAGATC CAGTTATTTT ACTTTTCAGC TTCAAAATAT      900
AGTTAAACCT TTGCCGCCAG TCAGTTGGAA ATATCTTACT TTTACTCGGG AGAGTTCATG      960
TGAAATTAAG CTGAAATGGA GCATACCTTT GTTTAGGCGT GGACCTATTC CAGCAAGGTG     1020
TTTTGATTAT GAAATTGAGA TCAGAGAAGA TGATACTACC GAAAGCATGG AGGAATTTTG     1080
GTGACTGCTA CAGTTGAAAA TGAAACATAC ACCTTGAAAA CAACAAATGA AACCCGAATA     1140
ATAGAGTTTT TAGTAGCAAT TATGCTTTGT AGTAAGAAGC AAAGTGAATA TTTATTGCTC     1200
AGATGACGGA ATTTGGGCAA AGAATCAAGT AGTGAGTGGG GTGATAAACA ATGCTGGGAA     1260
GGTGAAGACC TATCGAAGAA AACTTTGCTA GTAGCTGGGA TCGTTTCTGG CTACCATTTG     1320
GTTTCATCTT AATATTAGTT ATATTTGTAA CCGGTCTGCT TAGTGAATGT TGCCTAAGCC     1380
AAACACCTAC CCAAAAATGA TTCCAGAATT TTTCTGTGAT ACATGAAGAA GATTTGCATC     1440
TTTCCATATC AAGAGACATG GTATTGACTC AACAGTTTCC AGTCATGGCC AAATGTTCAA     1500
TATGAGTCTC AATAAACTGA ATTTTCTTGG CGAATGTTG      1539

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 380 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
- (G) TYPE DE CELLULE: renal
- (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
 1              5              10              15
Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
      20              25              30
Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
      35              40              45
Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
      50              55              60
Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
      65              70              75              80
Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
      85              90              95
Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
      100             105             110
Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr
      115             120             125

```


Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
 130 135 140
 Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
 145 150 155 160
 Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
 165 170 175
 Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
 180 185 190
 Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
 210 215 220
 Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
 225 230 235 240
 Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
 245 250 255
 Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
 260 265 270
 Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
 275 280 285
 Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu
 290 295 300
 Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly
 305 310 315 320
 Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
 325 330 335
 Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
 340 345 350
 Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
 355 360 365
 Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
 370 375 380

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 4009 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
- (G) TYPE DE CELLULE: RENAL
- (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCGGC CGGGCTCCGA GGCGAGAGGC TGCATGGAGT GGCCGGCGCG GCTCTGCGGG	60
CTGTGGGCGC TGCTGCTCTG CGCCGGCGGC GGGGGCGGGG GCGGGGCGC CGCGCCTACG	120
GAAACTCAGC CACCTGTGAC AAATTTGAGT GTCTCTGTTG AAAACCTCTG CACAGTAATA	180
TGGACATGGA ATCCACCCGA GGGAGCCAGC TCAAATTGTA GTCTATGGTA TTTTAGTCAT	240
TTTGGCGACA AACAAGATAA GAAAATAGCT CCGGAAACTC GTCGTTCAAT AGAAGTACCC	300
CTGAATGAGA GGATTTGTCT GCAAGTGGGG TCCCAGTGTA GCACCAATGA GAGTGAGAAG	360
CCTAGCATTT TGGTTGAAAA ATGCATCTCA CCCCAGAAG GTGATCCTGA GTCTGCTGTG	420
ACTGAGCTTC AATGCATTTG GCACAACCTG AGCTACATGA AGTGTTCTTG GCTCCCTGGA	480
AGGAATACCA GTCCCGACAC TAACTATACT CTCTACTATT GGCACAGAAG CCTGGAAAAA	540
ATTCATCAAT GTGAAAACAT CTTTAGAGAA GGCCAATACT TTGGTTGTTT CTTTGATCTG	600
ACCAAAGTGA AGGATTCCAG TTTTGAACAA CACAGTGTCC AAATAATGGT CAAGGATAAT	660
GCAGGAAAAA TTAAACCATC CTTCAATATA GTGCCTTTAA CTTCCCGTGT GAAACCTGAT	720
CCTCCACATA TTAAAAACCT CTCCTTCCAC AATGATGACC TATATGTGCA ATGGGAGAAT	780
CCACAGAATT TTATTAGCAG ATGCCTATTT TATGAAGTAG AAGTCAATAA CAGCCAAACT	840
GAGACACATA ATGTTTTCTA CGTCCAAGAG GCTAAATGTG AGAATCCAGA ATTTGAGAGA	900
AATGTGGAGA ATACATCTTG TTTCATGGTC CCTGGTGTTT TTCCTGATAC TTTGAACACA	960
GTCAGAATAA GAGTCAAAAC AAATAAGTTA TGCTATGAGG ATGACAAACT CTGGAGTAAT	1020
TGGAGCCAAG AAATGAGTAT AGGTAAGAAG CGCAATTCCA CACTCTACAT AACCATGTTA	1080
CTCATTGTTC CAGTCATCGT CGCAGGTGCA ATCATAGTAC TCCTGCTTTA CCTAAAAAGG	1140
CTCAAGATTA TTATATTCCC TCCAATTCCCT GATCCTGGCA AGATTTTAA AGAAATGTTT	1200
GGAGACCAGA ATGATGATAC TCTGCACTGG AAGAAGTACG ACATCTATGA GAAGCAAACC	1260
AAGGAGGAAA CCGACTCTGT AGTGCTGATA GAAACCTGA AGAAAGCCTC TCAGTGATGG	1320
AGATAATTTA TTTTACCTT CACTGTGACC TTGAGAAGAT TCTTCCCAT CTCCATTGT	1380
TATCTGGGAA CTTATTAAAT GGAAACTGAA ACTACTGCAC CATTTAAAAA CAGGCAGCTC	1440
ATAAGAGCCA CAGGTCTTTA TGTGAGTCG CGCACCAGAA AACTAAAAAT AATGGGCGCT	1500
TTGGAGAAGA GTGTGGAGTC ATTCTCATTG AATTATAAAA GCCAGCAGGC TTCAAACCTAG	1560
GGGACAAAGC AAAAAGTGAT GATAGTGGTG GAGTTAATCT TATCAAGAGT TGTGACAACT	1620
TCCTGAGGGA TCTATACTTG CTTTGTGTTT TTTGTGTCAA CATGAACAAA TTTTATTTGT	1680
AGGGGAACTC ATTTGGGGTG CAAATGCTAA TGTCAAACTT GAGTCACAAA GAACATGTAG	1740
AAAACAAAAT GGATAAAATC TGATATGTAT TGTTTGGGAT CCTATTGAAC CATGTTTGTG	1800
GCTATTAAAA CTCTTTTAAC AGTCTGGGCT GGGTCCGGTG GCTCACGCCT GTAATCCCAG	1860
CAATTTGGGA GTCCGAGGCG GCGGATCAC TCGAGGTCAG GAGTCCAGA CCAGCCTGAC	1920
CAAAATGGTG AAACCTCCTC TCTACTAAAA CTACAAAAAT TAACTGGGTG TGGTGGCGCG	1980
TGCCTGTAAT CCCAGCTACT CGGGAAGCTG AGGCAGGTGA ATTGTTTGAA CCTGGGAGGT	2040

GGAGGTTGCA	GTGAGCAGAG	ATCACACCAC	TGCACTCTAG	CCTGGGTGAC	AGAGCAAGAC	2100
TCTGTCTAAA	AAACAAAACA	AAACAAAACA	AAACAAAAAA	ACCTCTTAAT	ATTCTGGAGT	2160
CATCATTTCCC	TTGACAGCA	TTTTCTCTG	CTTTGAAAGC	CCCAGAAATC	AGTGTGGGCC	2220
ATGATGACAA	CTACAGAAAA	ACCAGAGGCA	GCTTCTTTGC	CAAGACCTTT	CAAAGCCATT	2280
TTAGGCTGTT	AGGGGCAGTG	GAGGTAGAAT	GACTCCTTGG	GTATTAGAGT	TTCAACCATG	2340
AAGTCTCTAA	CAATGTATTT	TCTTCACCTC	TGCTACTCAA	GTAGCATTTA	CTGTGTCTTT	2400
GGTTTGTGCT	AGGCCCCCGG	GTGTGAAGCA	CAGACCCCTT	CCAGGGGTTT	ACAGTCTATT	2460
TGAGACTCCT	CAGTTCTTGC	CACTTTTTTT	TTTAATCTCC	ACCAGTCATT	TTTCAGACCT	2520
TTTAACTCCT	CAATTCCAAC	ACTGATTTCC	CCTTTTGCAT	TCTCCCTCCT	TCCCTTCCTT	2580
GTAGCCTTTT	GACTTTTCATT	GGAAATTAGG	ATGTAAATCT	GCTCAGGAGA	CCTGGAGGAG	2640
CAGAGGATAA	TTAGCATCTC	AGGTTAAGTG	TGAGTAATCT	GAGAAACAAT	GACTAATTCT	2700
TGCATATTTT	GTAACCTCCA	TGTGAGGGTT	TTCAGCATTG	ATATTTGTGC	ATTTTCTAAA	2760
CAGAGATGAG	GTGGTATCTT	CACGTAGAAC	ATTGGTATTC	GCTTGAGAAA	AAAAGAATAG	2820
TTGAACCTAT	TTCTCTTTCT	TTACAAGATG	GGTCCAGGAT	TCCTCTTTTC	TCTGCCATAA	2880
ATGATTAATT	AAATAGCTTT	TGTGTCTTAC	ATTGGTAGCC	AGCCAGCCAA	GGCTCTGTTT	2940
ATGCTTTTGG	GGGGCATATA	TTGGGTTCOA	TTCTCACCTA	TCCACACAAC	ATATCCGTAT	3000
ATATCCCCTC	TACTCTTACT	TCCCCCAAAT	TTAAAGAAGT	ATGGGAAATG	AGAGGCATTT	3060
CCCCCACCCC	ATTTCTCTCC	TCACACACAG	ACTCATATTA	CTGGTAGGAA	CTTGAGAACT	3120
TTATTTCCAA	GTTGTTCAAA	CATTTACCAA	TCATATTAAT	ACAATGATGC	TATTTGCAAT	3180
TCCTGCTCCT	AGGGGAGGGG	AGATAAGAAA	CCCTCACTCT	CTACAGGTTT	GGGTACAAGT	3240
GGCAACCTGC	TTCCATGGCC	GTGTAGAAGC	ATGGTGCCCT	GGCTTCTCTG	AGGAAGCTGG	3300
GGTTCATGAC	AATGGCAGAT	GTAAAGTTAT	TCTTGAAGTC	AGATTGAGGC	TGGGAGACAG	3360
CCGTAGTAGA	TGTTCTACTT	TGTTCTGCTG	TTCTCTAGAA	AGAATATTTG	GTTTTCTGT	3420
ATAGGAATGA	GATTAATTCC	TTTCCAGGTA	TTTTATAATT	CTGGGAAGCA	AAACCCATGC	3480
CTCCCCCTAG	CCATTTTTAC	TGTTATCCTA	TTTAGATGGC	CATGAAGAGG	ATGCTGTGAA	3540
ATTCCCAACA	AACATTGATG	CTGACAGTCA	TGCAGTCTGG	GAGTGGGGAA	GTGATCTTTT	3600
GTTCCCATCC	TCTTCTTTTA	GCAGTAAAAT	AGCTGAGGGA	AAAGGGAGGG	AAAAGGAAGT	3660
TATGGGAATA	CCTGTGGTGG	TTGTGATCCC	TAGGTCTTGG	GAGCTCTTGG	AGGTGTCTGT	3720
ATCAGTGGAT	TTCCCATCCC	CTGTGGGAAA	TTAGTAGGCT	CATTTACTGT	TTTAGGTCTA	3780
GCCTATGTGG	ATTTTTTCCT	AACATACCTA	AGCAAACCCA	GTGTCAGGAT	GGTAATTCTT	3840
ATTCTTTTCGT	TCAGTTAAGT	TTTTCCCTTC	ATCTGGGCAC	TGAAGGGATA	TGTGAAACAA	3900
TGTTAACATT	TTTGGTAGTC	TTCAACCAGG	GATTGTTTCT	GTTTAACTTC	TTATAGGAAA	3960
GCTTGAGTAA	AATAAATATT	GTCTTTTTGT	ATGTCACCCA	AAAAAATAA		4009

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 427 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (F) TYPE DE TISSUE: Carcinoma
- (G) TYPE DE CELLULE: renal
- (H) LIGNEE CELLULAIRE: Caki-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
1          5          10          15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
20          25          30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
35          40          45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
50          55          60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
65          70          75          80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
85          90          95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile
100         105         110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
115         120         125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
130         135         140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu
145         150         155         160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
165         170         175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
180         185         190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
195         200         205

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
210         215         220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
225         230         235         240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
245         250         255

Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
260         265         270

```

Asn	Val	Phe	Tyr	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Cys	Glu	Asn	Pro	Glu	Phe	Glu
	275						280					285			
Arg	Asn	Val	Glu	Asn	Thr	Ser	Cys	Phe	Met	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Pro
	290					295					300				
Asp	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys
305					310					315					320
Tyr	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Gln	Glu	Met	Ser	Ile
				325					330					335	
Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Met	Leu	Leu	Ile	Val
			340					345					350		
Pro	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Lys
		355					360					365			
Arg	Leu	Lys	Ile	Ile	Ile	Phe	Pro	Pro	Ile	Pro	Asp	Pro	Gly	Lys	Ile
	370					375					380				
Phe	Lys	Glu	Met	Phe	Gly	Asp	Gln	Asn	Asp	Asp	Thr	Leu	His	Trp	Lys
385					390					395					400
Lys	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gln	Thr	Lys	Glu	Glu	Thr	Asp	Ser	Val
				405					410					415	
Val	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Ala	Ser	Gln					
			420					425							

REVENDICATIONS

- 5 1. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :
- a) la séquence SEQ ID n° 2,
- b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2.
- 10 2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2.
- 15 3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme variante du polypeptide de séquence SEQ ID n°2 dans laquelle les 8 résidus C-terminaux sont substitués par les 6 résidus suivants : VRCVTL.
- 20 4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au résidu 337.
5. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
- 25 6. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
- a) la séquence SEQ ID n° 1,
- b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur β de l'IL-13,

c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.

- 5 7. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081 et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.
- 10 8. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :
a) la séquence SEQ ID n° 4,
b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 4.
- 15 9. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 4.
- 20 10. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.
11. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 10.
- 25 12. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
a) la séquence SEQ ID n°3,

- b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 3 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur α de l'IL-13,
- c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.
- 5
13. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1059, et
10 préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3.
14. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acides
15 nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13.
15. Vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide PSE-1.
- 20
16. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 14 ou 15.
17. Cellule hôte transfectée selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée COS-7, COS-3 ou CHO.
- 25
18. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 5 à 7, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants.

19. Sonde selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 nucléotides.
- 5 20. Sonde selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.
- 10 21. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 11 à 13, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants.
- 15 22. Sonde selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 nucléotides
23. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la SEQ ID n°3 ou de son brin complémentaire.
- 20 24. Séquence antisens capable d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences constituant le cadre de lecture codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10 au niveau du transcript.
- 25 25. Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13, pour la réalisation de sondes nucléotidiques de diagnostic ou de séquences antisens utilisables en thérapie génique.

- 5 26. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.
- 10 27. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, pour la détection d'anomalies chromosomiques.
- 15 28. Méthode de diagnostic *IN VITRO* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après
 - 20 une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
 - éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le
 - 25 complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.
29. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13 pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.

30. Méthode de production d'un polypeptide recombinant récepteur de l'IL-13, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules transfectées selon la revendication 16 ou 17 dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou de séquence SEQ ID n° 4 ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
31. Anticorps mono ou polyclonaux, anticorps conjugués, ou leur fragments, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.
32. Utilisation des anticorps selon la revendication précédente, pour la purification ou la détection d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10 dans un échantillon biologique.
33. Procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale du récepteur de l'IL-13, à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir le récepteur de l'IL-13 exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps selon la revendication 31 avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.
34. Kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale du récepteur de l'IL-13 dans un prélèvement biologique et/ou pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique du récepteur de l'IL-13 selon la revendication 31, éventuellement fixé sur un support,
- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

5

35. Méthode pour l'identification et/ou l'isolement de polypeptides selon la revendication 1 ou 8, ou d'agents capables de moduler leur activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface un polypeptide selon la revendication 1 ou 8, dans des conditions permettant l'interaction entre le polypeptide et ledit composé dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le polypeptide, et en ce que l'on détecte et/ou isole les composés liés au polypeptide ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

10

15

36. Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 4 ou 8 à 10 susceptible d'être obtenu selon la méthode de la revendication 35.

20

37. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10.

38. Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon la revendication 4 ou 10.

25

39. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R β .
- 5 40. Utilisation d'un polypeptide selon l'un quelconque des revendications 8 à 10 pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R α .
- 10 41. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R β .
- 15 42. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R α .
43. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 4 ou 10 pour la synthèse d'un médicament à effet antagoniste de l'IL-13.

REVENDEICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 16 avril 1997 (16.04.97);
revendication 28 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

26. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.
27. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, pour la détection d'anomalies chromosomiques.
28. Méthode de diagnostic *IN VITRO* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 18 à 23 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
 - éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.
29. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et 11 à 13 pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 8 à 10.